

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

**Untersuchung
zweier ENU-induzierter mutanter Mauslinien
mit Fokus auf eine Linie
mit einer Punktmutation im Uromodulin-Gen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Petra Christine Prückl
aus
Ergoldsbach

München 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Aigner

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Scholz

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

Meinen Eltern
und meiner Oma

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Strategien der Mausmutagenese	2
2.	ENU-Mausmutagenese.....	3
2.1.	N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) als Mutagen.....	3
2.2.	Phänotyp-basierte ENU-Mausmutageneseprojekte.....	3
2.3.	Ablauf von phänotyp-basierten ENU-Mutageneseprojekten	4
2.3.1.	Mutagenese.....	4
2.3.2.	Phänotypuntersuchung	5
2.3.3.	Etablierung von mutanten Linien	6
2.3.4.	Genotypuntersuchung.....	6
3.	ENU-induzierte Mausmodelle mit veränderter Nierenfunktion.....	7
4.	Uromodulin (Umod; Tamm-Horsfall Protein, THP)	12
4.1.	Aufbau und Funktion der Niere.....	12
4.2.	Gen, Expression und Struktur von <i>UMOD</i>	13
4.3.	Funktion des dicken aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife (TALH) 15	
4.4.	Eigenschaften und klinische Relevanz von Uromodulin	16
4.5.	Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankungen beim Menschen	18
4.6.	Uromodulin-mutante Mausmodelle	20
4.6.1.	Knockout-Mäuse	20
4.6.2.	<i>Umod</i> ^{A227T} mutante Mauslinie.....	23
4.6.3.	Transgene Mauslinie mit humanem mutantem <i>UMOD</i> (C148W)	26
4.6.4.	Tg ^{<i>Umod</i>C147W} transgene Mauslinie	26
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	28
1.	Tiere und Tierzucht.....	28
1.1.	Tierhaltung	28
1.2.	Tierversuch.....	28
1.3.	Versuchstiere	28
1.4.	Erhaltungszucht	29
1.5.	Zucht für die Kopplungsanalyse.....	29
1.6.	Zucht homozygot mutanter F2-Hybridtiere der Linie SMA002	30

1.7.	Zucht eines kongenen Stammes für die Linie SMA002.....	31
2.	Methoden.....	31
2.1.	Blut	31
2.2.	DNA	32
2.3.	RNA und cDNA-Synthese	33
2.4.	PCR, RT-PCR und „Cycle-Sequencing“-Verfahren	34
2.5.	Gelelektrophorese und Sequenzanalyse	38
2.5.1.	Agarosegelelektrophorese	38
2.5.2.	Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten	38
3.	Kopplungsanalyse.....	38
3.1.	Grobkartierung der Linie HST001	39
3.2.	Feinkartierung der Linien HST001 und SMA002.....	40
3.3.	Untersuchung zum Auftreten von homozygoten Mutanten in der Linie SMA002	42
4.	Suche nach der ursächlichen Mutation	42
4.1.	HST001	42
4.1.1.	Kandidatengen.....	42
4.1.2.	Sequenzanalyse	42
4.1.3.	Allelspezifische PCR zur Genotypisierung	43
4.2.	SMA002	43
4.2.1.	Kandidatengene	43
4.2.2.	Sequenzanalyse	44
4.2.2.1.	<i>Ntrk2</i>	44
4.2.2.2.	<i>Agtpbp1</i>	44
5.	Phänotypuntersuchung der Mauslinie HST001	45
5.1.	Klinisch-chemische Blutuntersuchung.....	46
5.2.	Hämatologie	46
5.3.	Urin- und Nierenfunktionsuntersuchung.....	46
5.4.	Westernblot von Urinproben	47
5.5.	Morphologische Untersuchung	47
5.6.	Vergleich der Körpergewichtsentwicklung von Tieren aus Anpaarungen von heterozygoten Mutanten.....	48
5.7.	Weitere phänotypische Untersuchungen	48

6.	Statistik.....	48
IV.	ERGEBNISSE	49
1.	Mauslinie HST001	49
1.1.	Ausgangspunkt der Arbeit.....	49
1.2.	Identifikation der ursächlichen Mutation	50
1.2.1.	Grobkartierung	50
1.2.2.	Feinkartierung	54
1.2.3.	Kandidatengenanalyse.....	55
1.2.4.	Zuchtdaten aus Anpaarungen von heterozygoten Mutanten	58
1.3.	Untersuchung des Phänotyps.....	58
1.3.1.	Morphologie und Stoffwechsel	61
1.3.1.1.	Morphologie von 2 Wochen alten Mutanten.....	61
1.3.1.2.	Morphologie von 35–36 Wochen alten heterozygoten Mutanten	62
1.3.1.3.	Morphologie und Stoffwechsel von 39–42 Wochen alten heterozygoten Mutanten	62
1.3.1.4.	Morphologie von 50–51 Wochen alten heterozygoten Mutanten.....	64
1.3.1.5.	Morphologie von 84–99 Wochen alten heterozygoten Mutanten	67
1.3.1.6.	Körpergewichtsentwicklung.....	69
1.3.2.	Klinische Chemie und Hämatologie.....	71
1.3.2.1.	Blutdaten von 2 Wochen alten mutanten Mäusen.....	71
1.3.2.2.	Blutdaten von 4 Wochen alten mutanten Mäusen.....	74
1.3.2.3.	Blutdaten von 7 Wochen alten mutanten Mäusen.....	76
1.3.2.4.	Blutdaten von 12–13 Wochen alten mutanten Mäusen.....	78
1.3.2.5.	Blutdaten von 35–37 Wochen alten mutanten Mäusen.....	81
1.3.2.6.	Blutdaten von 84–99 Wochen alten mutanten Mäusen.....	85
1.3.2.7.	Verlauf ausgewählter Blutparameter	86
1.3.3.	Weitere Ergebnisse aus der Untersuchung in der „GMC“	90
1.3.3.1.	Funktionelle Nierenparameter	90
1.3.3.2.	Langzeitwirkung der Hyperkalziurie.....	97
1.3.3.3.	Kreislaufdaten von 32–38 Wochen alten heterozygoten Mutanten	98
2.	Mauslinie SMA002	100
2.1.	Ausgangspunkt der Arbeit.....	100
2.2.	Untersuchung der ursächlichen Mutation.....	101
2.2.1.	Feinkartierung	101

2.2.2.	Kandidatengenanalyse.....	104
2.2.3.	Untersuchung des Auftretens homozygoter Mutanten.....	106
2.2.4.	Zucht eines kongenen Stammes.....	107
2.3.	Ausblick.....	108
V.	DISKUSSION.....	109
1.	Ursächliche Mutation im <i>Umod</i>-Gen.....	109
2.	Uromodulinausscheidung.....	110
3.	„Gain-of-toxic-function“-Mutation von Uromodulin in der Niere.....	110
4.	Beginn und Progression der Nierenfunktionsstörung.....	113
5.	Extra-renaler Phänotyp.....	114
6.	Blut und Kreislauf.....	115
7.	Fazit und Ausblick.....	115
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	117
VII.	SUMMARY.....	119
VIII.	TABELLENVERZEICHNIS.....	121
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	123
X.	LITERATURVERZEICHNIS.....	124
XI.	ANHANG.....	138
1.	Material.....	138
2.	Zusammensetzung von Puffern und Lösungen.....	140
XII.	DANKSAGUNG.....	143

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

10e9	10 ⁹ Zellen
10e12	10 ¹² Zellen
χ^2	Chi-Quadrat
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
A	Adenin
<i>Agtpbp1</i>	„ATP/GTP binding protein 1“-Gen bei der Maus
Ala	Alanin
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	alkalische Phosphatase
As/aa	Aminosäure/n (amino acid)
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
AST	Aspartat-Aminotransferase
B6C3F1	erste Filialgeneration der Kreuzung C57BL/6 × C3H
BALB/c	BALB/cJ-Mausinzuchtstamm
bidest.	bidestillata
bp	Basenpaare (base pairs)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C3H	C3HeB/FeJ-Mausinzuchtstamm
C57BL/6	C57BL/6Jico-Mausinzuchtstamm
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CAKUT	angeborene Anomalien der Nieren und des Harntraktes (congenital anomalies of the kidney and the urinary tract)
cbEGF	„calcium binding epidermal growth factor“
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary deoxyribonucleic acid)
Chr	Chromosom
CiA	Chloroform-Isoamylalkohol
Cl ⁻	Chlorid
CLC-Kb	basolateraler Cl ⁻ -Kanal
cm	Zentimeter
cM	Centi-Morgan
cm ²	Quadratzentimeter
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
DXA	Doppelröntgenabsorptiometrie (dual-energy X-ray absorptiometry)

E	Tag der Trächtigkeit
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“
Ekrea	Kreatinin, enzymatisch bestimmt
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay)
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
F1=N1–F2	erste bis zweite Filialgeneration
FE	fraktionelle Exkretion
FELASA	„Federation of European Laboratory Animal Science Associations“
FEx	fraktionelle Exkretion eines Stoffes x
FJHN	familiär juvenile hyperurikämische Nephropathie (familial juvenile hyperuricemic nephropathy)
fl	Femtoliter
fmol	Femtomol
g	Gramm
G	Guanin
G0–G4	Generation null bis vier
GCKD	glomerulozystische Nierenerkrankung (glomerulocystic kidney disease)
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Glu	Glutaminsäure
GMC	„German Mouse Clinic“
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HB	Hämoglobin
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HDL	„High Density Lipoprotein“
Het	heterozygote Mutanten
HKT	Hämatokrit
H ₂ O	Wasser
Hom	homozygote Mutanten
HS	Harnsäure
IGF	„insulin-like growth factor“
inkl.	inklusive
INT	Intron
INT1	Wildtypallelspezifischer Reverse Primer
INT2	Mutantenallelspezifischer Forward Primer
IRI	Ischämie-Reperfusionserkrankungen (ischemia-reperfusion injury)
K ⁺	Kalium
kb	Kilo-Basenpaare (kilo base pairs)
KCC4	basolateraler K ⁺ -Cl ⁻ -Kotransporter-4
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
Krea	Kreatinin mit Jaffe-Methode bestimmt
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
lt.	laut
LV	linksventrikulär
LVID	linksventrikulärer Innendurchmesser
m	männlich
M	Molar (mol/l)
Mb	Megabasen
MCH	mittlerer Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (mean corpuscular hemoglobin)
MCHC	mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (mean corpuscular hemoglobin concentration)
MCKD2	medullär-zystische Nierenerkrankung Typ 2 (medullary cystic kidney disease type 2)
MCV	mittleres Erythrozytenvolumen (mean corpuscular volume)
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (= mmol/l)
mmol	Millimol
MODY5	früh auftretender Diabetes Typ 5 (maturity-onset diabetes of the young type 5)
mOsm/kg	Milliosmol/kg
MPV	mittlere Thrombozytengröße (mean platelet volume)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
Mut	Mutant/e/n
Mut-Allel	Mutantenallel
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N2–N10	erste bis neunte Rückkreuzungsgeneration
n.a.	nicht auswertbar
NA	nicht angegeben
Na ⁺ /Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NEFA	nicht veresterte Fettsäuren (non-esterified fatty acids)
ng	Nanogramm
NKCC2	apikaler, elektroneutraler Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Kotransporter
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NRL	Nasenrumpflänge
n.s.	nicht signifikant
nt	Nukleotid/e
Nt-proANP	N-terminales Fragment vom pro-atrialen natriuretischen Peptid
<i>Ntrk2</i>	„neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2“-Gen bei der Maus
n.u.	nicht untersucht
OD	optische Dichte
p	p-Wert, Überschreitungswahrscheinlichkeit
PCiA	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
ph.	phänotypisch

pH	potentia hydrogenii
Pi	Phosphat, anorganisch (inorganic)
PLT	Thrombozyten
pmol	Pikomol
p.p.	post partum
RBC	Erythrozytenzahl (red blood cell count)
RDW	Erythrozytenverteilungsbreite (red cell distribution width)
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (restriction fragment length polymorphism)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROMK	apikaler K ⁺ -Kanal
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (ribosomal ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde
Ser	Serin
SLT	spezifischer Locus-Test
SNPs	Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms)
SPF	spezifiziert pathogen-frei
SSLP	Mikrosatelliten (Simple Sequence Length Polymorphisms)
T	Thymin
TALH	dicker aufsteigender Schenkel der Henleschen Schleife (thick ascending limb of Henle`s loop)
Tg-Mäuse	transgene Mäuse
THP	Tamm-Horsfall Protein
Thr	Threonin
TP	Gesamtprotein (total protein)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>TrkB</i>	„tyrosine kinase receptor B“-Gen bei der Maus
U	Einheit (unit)
UAKD	Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankungen (Uromodulin-associated kidney diseases)
Umod	Uromodulin-Protein
<i>Umod</i>	Uromodulin-Gen bei der Maus
<i>UMOD</i>	Uromodulin-Gen beim Menschen
<i>Umod</i> ^{-/-}	<i>Umod</i> -Knockout-Mäuse
<i>Umod</i> ^{+/+}	Wildtypkontrolltiere zu <i>Umod</i> -Knockout-Mäusen
UN	unbekannt
U/P	Urin/Plasma-Verhältnis
UPIa	Uroplakin Ia
UV	ultraviolett
vs.	versus
w	weiblich
WBC	Leukozytenzahl (white blood cell count)
Wo	Woche/n
Wt	Wildtyptiere
Wt-Allel	Wildtypallel
z.B.	zum Beispiel
ZP	Zona pellucida

I. EINLEITUNG

Die funktionale Genomanalyse dient dem Erkenntnisfortschritt bei der Untersuchung von Ursachen und Verlauf von Krankheiten sowie deren Behandlung. Der Vergleich von Genomsequenzen und/oder phänotypischen Parametern bei Mensch und weiteren Säugerspezies bietet die Möglichkeit, geeignete Tiermodelle für bestimmte physiologische oder pathologische Reaktionsabläufe zu identifizieren. Mäuse eignen sich als Modelltiere wegen der arbeits-, zeit- und kosteneffizienten Möglichkeit ihrer Haltung und Reproduktion sowie des Vorhandenseins von vielen Techniken zur Veränderung ihres Genoms (SILVER, 1995).

Die dominant mutanten Mauslinien HST001 und SMA002 wurden im Rahmen des phänotyp-basierten Münchener ENU-Mausmutageneseprojekts etabliert (HRABE DE ANGELIS et al., 2000). Die Etablierung und basale phänotypische Charakterisierung der Linien HST001 und SMA002 wurden bereits in Doktorarbeiten (HOWALDT, 2004; TRAN, 2004) dargestellt. Die Linie HST001 (= UREHD1) wurde mit Hilfe eines erhöhten Plasmaharnstoffwertes als Leitsymptom gezüchtet. Bei weiteren Untersuchungen wurden eine gesteigerte Futteraufnahme bei reduziertem Körpergewicht und reduziertem Körperfettgehalt in den mutanten Tieren festgestellt (TRAN, 2004). Des Weiteren wurden eine vermehrte Wasseraufnahme und ein gesteigertes Urinvolumen festgestellt. Die Zucht der Linie SMA002 erfolgte anhand der Leitsymptome eines geringen Körpergewichtes, einer geringen Körpergröße und von Verhaltensanomalien, die sich in häufigem Kratzen und vermehrtem Putzverhalten äußerten (HOWALDT, 2004).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Untersuchungen zur Identifikation der ursächlichen Mutation der Linien HST001 und SMA002 durchzuführen und nach dessen Identifikation den Phänotyp von homozygot mutanten und heterozygot mutanten Tieren im Vergleich zu Wildtypkontrollen weiter zu charakterisieren.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Strategien der Mausmutagenese

Zur Etablierung neuer Tiermodelle gibt es zwei komplementäre Möglichkeiten - den gen-basierten Ansatz sowie den phänotyp-basierten Ansatz (SILVER, 1995).

Beim gen-basierten Ansatz wird eine zu untersuchende Gensequenz in transgenen Tieren exprimiert oder die Funktion des entsprechenden Proteins modifiziert (BROWN & PETERS, 1996). Damit können durch definierte Veränderungen des Mausgenoms mit Hilfe von gentechnologischen Methoden für bekannte genetische Krankheiten spezifische Tiermodelle erzeugt werden. Allerdings spiegelt der daraus resultierende Phänotyp nicht immer die betreffende humane Krankheit wider (BROWN & BALLING, 2001).

Beim phänotyp-basierten Ansatz wird nach zufälliger Mutation einer großen Anzahl von Tieren dieses Tierkollektiv auf das Auftreten eines spezifischen Krankheitsphänotyps untersucht und nachfolgend die für diesen Phänotyp ursächliche Genmutation identifiziert. Dieser Ansatz setzt kein Vorwissen über die genetischen Komponenten bei den entsprechenden Krankheiten voraus.

Spontane Mutationen treten mit einer niedrigen Frequenz (5×10^{-6} per Genort) auf (STANFORD et al., 2001). Damit war es möglich, mehr als 1700 (<http://www.informatics.jax.org/>) phänotypisch mutante Mauslinien zu züchten und nachfolgend zu untersuchen. Des Weiteren wurden Methoden entwickelt, um Mutationen in vivo auf physikalischem oder chemischem Weg zu induzieren. Hierdurch wurde die Mutationsfrequenz und somit die Anzahl von mutanten Mauslinien gesteigert (HRABE DE ANGELIS et al., 2007).

Bei der physikalischen Mutagenese wurden die Mäuse ionisierender Strahlung (Röntgen-, Gamma- oder Neutronenstrahlen) ausgesetzt. Hierbei kam es im Genom oft zu großen Deletionen oder anderen großen Genomläsionen, wie Translokationen oder komplexen Rearrangierungen (STANFORD et al., 2001), die die Analyse individueller Genfunktionen erschwerten. Daneben wurden zahlreiche Chemikalien hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Mutationen in Keimzellen zu induzieren, untersucht (HRABE DE ANGELIS et al., 2007). N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) ist zur Zeit das Mittel der Wahl zur Erzeugung von Mutationen in der Maus, da es hauptsächlich Punktmutationen in spermatogonischen Stammzellen induziert. Die Chemikalie ist hocheffizient und resultiert in einer großen Anzahl von mutanten

Nachkommen der verpaarten ENU-behandelten Mäuseböcke (RUSSELL et al., 1979; STANFORD et al., 2001).

2. ENU-Mausmutagenese

2.1. N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) als Mutagen

ENU ist das wirksamste bekannte Mutagen bei der Maus (RUSSELL et al., 1979). Bei einer optimalen Dosierung von ENU können Mutationen in prämeiotischen Spermatogonien mit einer Effizienz von über $1,5-6 \times 10^{-3}$ per Genort erreicht werden (HITOTSUMACHI et al., 1985; SHEDLOVSKY et al., 1993). Die Effizienz der Mutagenese hängt neben der injizierten Dosis auch vom verwendeten Mäusestamm ab (HITOTSUMACHI et al., 1985).

ENU modifiziert Nukleotide (nt) durch Alkylierung. So kann die Ethylgruppe von ENU auf Sauerstoff- oder Stickstoff-Radikale in verschiedenen reaktiven Gruppen des Nukleotids übertragen werden. In der nachfolgenden DNA-Replikation der Zelle kann es zu einer Fehlidentifizierung dieser ethylierten Base und somit zu einem falschen Baseneinbau im neu synthetisierten Strang kommen. Wenn Keimzellen betroffen sind, wird dieser fehlerhafte Baseneinbau auf die Nachkommen vererbt (SHIBUYA & MORIMOTO, 1993). Die Identifikation von ENU-induzierten Mutationen in der Keimbahn von Mäusen zeigte, dass die Chemikalie hauptsächlich A / T-Basenpaarveränderungen verursacht (JUSTICE et al., 1999; BARBARIC et al., 2007; TAKAHASI et al., 2007). Dies führt bei den entsprechenden Proteinen an dieser Stelle zum Austausch einer Aminosäure, zur Bildung fehlerhafter Spleißprodukte oder zum Translationsstop (JUSTICE et al., 1999; BARBARIC et al., 2007).

2.2. Phänotyp-basierte ENU-Mausmutageneseprojekte

Weltweit werden zahlreiche phänotyp-basierte ENU-Projekte durchgeführt (Tabelle 1). Hierbei wird mit unterschiedlichen Zielsetzungen und/oder unterschiedlichen Mausstämmen als genetischem Hintergrund gearbeitet (RUSS et al., 2002).

Tabelle 1: Durchgeführte ENU-Mausmutageneseprojekte (modifiziert nach HRABE DE ANGELIS et al., 2007)

ENU-Projekt: Institut und Lokalisation	URL
Australian National University, Canberra, Australien	http://www.apf.edu.au/about/
Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA	http://www.mouse-genome.bcm.tmc.edu/ENU/ENUhome.asp
Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, San Diego, CA, USA	http://www.gnf.org/technology/organismal/mammalian-genetics-phenotyping.htm
Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Deutschland	http://www.helmholtz-muenchen.de/en/ieg/group-functional-genetics/enu-screen/index.html
Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, Maryland, USA	http://www.hhmi.org/research/investigators/niswander.html
Institute of Neurological Sciences, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, USA	http://www.med.upenn.edu/ins/faculty/bucan
Medical Research Council Harwell, Oxfordshire, UK	http://www.har.mrc.ac.uk/research/mutagenesis/
The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA	http://nmf.jax.org/ ; http://pga.jax.org/index.html

Das Münchener ENU-Mausmutageneseprojekt untersucht in großem Umfang phänotypische Abnormalitäten, um mutante Phänotypen für morphologische, klinisch-chemische, biochemische, hämatologische und immunologische Defekte sowie für Allergien und Verhaltensauffälligkeiten zu identifizieren. Mit dem standardisierten Münchener Protokoll können 135 Parameter analysiert werden. Die Mutagenese der Tiere erfolgte am Helmholtz Zentrum München und am Moorversuchsgut des Instituts für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München. Die Untersuchungen der Nachkommen wurden von vielen Forschergruppen mit ihrer spezifischen Expertise durchgeführt (SOEWARTO et al., 2000; <http://www.helmholtz-muenchen.de/en/ieg/group-functional-genetics/enu-screen/index.html>)

2.3. Ablauf von phänotyp-basierten ENU-Mutageneseprojekten

2.3.1. Mutagenese

ENU besitzt je nach Dosierung und Behandlungsprotokoll eine unterschiedliche mutagene Wirkung. Die Mutationsrate, die durch eine ENU-Behandlung induziert wird, kann entweder durch funktionale Tests wie z.B. dem spezifischen Locus-Test (SLT) (RUSSELL et al., 1979) oder physikalisch durch Sequenzanalyse bestimmt werden. Dabei wurden Mutationsfrequenzen von einem Basenpaaraustausch in 1,0–2,5 Megabasen (Mb) gefunden (RUSS et al., 2002). Es wurde eine Korrelation zwischen einer Einzeldosis von 80–250 mg/kg

Körpergewicht (KGW) auf die Mutationsrate in prämeiotischen Spermatogonien festgestellt (RUSSELL et al., 1982; CHARLES & PRETSCH, 1987). Des Weiteren erkannte man, dass die Mutationsrate durch wöchentliche Dosen von 100 mg/kg KGW bis zu einer Gesamtdosis von 300–400 mg/kg KGW um das 1,8- bzw. 2,2fache gegenüber der Wirkung einer maximalen Einzeldosis von 250 mg/kg KGW gesteigert werden kann (RUSSELL et al., 1982; HITOTSUMACHI et al., 1985). Ebenso korreliert die Dauer der Sterilität mit der Dosis und den Behandlungsintervallen von ENU (HITOTSUMACHI et al., 1985). ENU-Mausmutageneseprojekte werden mit unterschiedlichen Inzuchtstämmen durchgeführt (BALB/cJ, C3HeB/FeJ, C57BL/6Jlco). Im Münchener ENU-Mutageneseprojekt wurden männliche Tiere des Inzuchtstammes C3HeB/FeJ (C3H) im Alter von zwölf Wochen mit drei Dosen von 90 mg/kg KGW im wöchentlichem Intervall behandelt und fünf Wochen nach der letzten Injektion mit weiblichen C3H-Tieren verpaart (RATHKOLB et al., 2000; HRABE DE ANGELIS et al., 2007).

2.3.2. Phänotypuntersuchung

In Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund des verwendeten Mausstammes und von den Umwelt- und Untersuchungsbedingungen können die induzierten Mutationen eine Vielzahl von unphysiologischen Phänotypen auslösen. Die Phänotypuntersuchung eines großen Spektrums von Parametern (z.B. Morphologie, klinisch-chemische Blutuntersuchung, Immunologie, Verhalten) gewährleistet, dass viele Organsysteme und Reaktionsabläufe, analog der klinischen Untersuchung beim Menschen, analysiert werden. Auch aus Sicht des Tierschutzes ist die optimale Verwendung der mutagenisierten Tiere durch Untersuchung von möglichst vielen phänotypischen Parametern zu unterstützen. Um die Reproduzierbarkeit und die Vergleichbarkeit der phänotypischen Ergebnisse zu gewährleisten, sollten die Mausstämme unter standardisierten Bedingungen gehalten und die phänotypische Untersuchung nach Standardprotokollen durchgeführt werden (HRABE DE ANGELIS et al., 2007). So führen verschiedene Blutentnahmetechniken zu erheblichen Unterschieden in den gemessenen Blutparameterwerten (DOEING et al., 2003). Einige Untersuchungen, die routinemäßig bei der medizinischen Untersuchung beim Menschen angewendet werden, wurden für das Münchener ENU-Mausmutageneseprojekt adaptiert (HRABE DE ANGELIS et al., 2000; SOEWARTO et al., 2000). Zur Analyse von Verhaltensabnormalitäten und morphologischen Defekten wurde das SHIRPA-Protokoll (Smith Kline Beecham Pharmaceuticals; Harwell, MRC, Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit; Imperial College School of Medicine at St. Mary's; Royal London Hospital, St

Bartholomew`s and the Royal London School of Medicine; **Phenotype Assessment**) weiter entwickelt (ROGERS et al., 1997; HRABE DE ANGELIS et al., 2000).

2.3.3. Etablierung von mutanten Linien

Durch die Züchtung von phänotypisch auffälligen Tieren und die phänotypische Untersuchung der Nachkommen kann die Weitergabe des veränderten Phänotyps auf nachfolgende Generationen bestätigt und somit eine Mutation als Ursache für den anomalen Phänotyp festgestellt werden. Zur Suche nach dominanten Mutationen werden G1-Tiere herangezogen, die aus der Verpaarung von mutagenisierten männlichen G0-Tieren mit weiblichen Tieren des gleichen oder eines anderen Inzuchtstammes hervorgingen. Eine G1-Maus mit einem anomalen Phänotyp wird mit einem Wildtypier des anderen Geschlechts verpaart, um die Vererbung an deren G2-Nachkommen zu prüfen. Um nach rezessiven Mutationen zu suchen, werden G3-Mäuse benötigt, die in einem Zwei-Stufen-Verfahren gezüchtet werden. Dabei werden männliche G1-Mäuse, die bei der Untersuchung nach dominanten Mutationen keinen anomalen Phänotyp zeigten, mit weiblichen Wildtypieren verpaart, um weibliche G2-Nachkommen zu produzieren. Diese werden mit dem männlichen G1-Foundertier gekreuzt, um G3-Nachkommen zu erhalten. Alternativ können auch G2-Tiere miteinander gekreuzt werden, um G3-Nachkommen zu produzieren. Die Vererbung eines anomalen Phänotyps in G3-Mäusen wird an deren Nachkommen getestet. Dies geschieht entweder durch Rückkreuzung auf die männliche G1-Maus der Zuchtlinie (im Falle eines weiblichen G3-Tieres) oder durch Rückkreuzung auf die entsprechende weibliche G2-Maus (im Falle eines männlichen G3-Tieres). Der Erbgang kann auch nach Erstellung von zwei weiteren Generationen an Nachkommen einer Kreuzung von G4-Tieren oder einer G4 × G3-Rückkreuzung getestet werden (CORDES, 2005; AIGNER et al., 2007; HRABE DE ANGELIS et al., 2007).

2.3.4. Genotypuntersuchung

Nach Etablierung einer mutanten Mauslinie mit dominanter oder rezessiver Mutation erfolgt die Analyse zur Identifizierung der ursächlichen Mutation. Die Bestimmung der chromosomalen Lage der ursächlichen Mutation wird mit Hilfe einer Kopplungsanalyse durchgeführt. Hierzu werden phänotypisch mutante Tiere mit Wildtypmäusen eines zweiten Inzuchtstammes verpaart. Die F1-Hybridgeneration wird auf den mutanten Phänotyp des Elterntiers untersucht. Zur Erstellung der nächsten Generation werden F1-Hybriden mit mutantem Phänotyp auf Wildtypmäuse des zweiten Inzuchtstammes zurückgekreuzt (für dominante Mutationen) bzw. F1-Hybridtiere miteinander verpaart (für rezessive Mutationen).

Die Nachkommen werden wieder phänotypisiert und in zwei Gruppen – phänotypisch mutante Tiere und phänotypisch unauffällige Tiere – eingeteilt. In der Regel werden die phänotypisch mutanten Tiere zur nachfolgenden genotypischen Untersuchung herangezogen. Eine genomweite Kopplungsanalyse von DNA-Proben dieser Tiere mit polymorphen DNA-Markern deckt die chromosomale Lage der ursächlichen Mutation auf (HRABE DE ANGELIS et al., 2007). Mikrosatelliten (Simple Sequence Length Polymorphisms, SSLP) als polymorphe DNA-Marker besitzen tandemartige Wiederholungen kurzer Sequenzmotive (2–4 Basenpaare [bp]). Verschiedene Inzuchtstämme haben unterschiedlich lange Mikrosatellitenmarker, somit ist eine Stammzuordnung des entsprechenden Genomlocus in den Nachkommen der Verpaarungen für die Kopplungsanalyse möglich (SILVER, 1995). Als weitere DNA-Marker stehen Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) als natürliche Sequenzvariationen der Inzuchtstämme zur Verfügung (PETKOV et al., 2004a; PETKOV et al., 2004b; MORAN et al., 2006). Der Nachweis erfolgt bei Mikrosatelliten durch die Gelelektrophorese von Polymerasekettenreaktion (PCR)-Produkten, und bei SNPs durch Restriktionsenzymbehandlung (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus [RFLP]-Analyse) bzw. direkte Sequenzanalyse von PCR-Produkten (SILVER, 1995). Nach der Identifizierung der chromosomalen Lage der ursächlichen Mutation schließt sich die Feinkartierung an, um die chromosomale Lage weiter einzugrenzen. Die Feinkartierung wird mit Hilfe von weiteren polymorphen DNA-Markern (Mikrosatelliten, SNPs) im gleichen Tierpool wie bei der Grobkartierung bzw. an zusätzlich erstellten Tieren durchgeführt. Zuletzt erfolgt eine Kandidatengenanalyse, in der Regel durch Sequenzierung ausgewählter Gene, um die ursächliche Mutation zu identifizieren. Nach der Identifikation einer Mutation in einer kartierten chromosomalen Region mit einer Länge von 5 Mb ist die Wahrscheinlichkeit gering ($p < 0,05$), dass eine weitere ENU-induzierte Mutation mit der ermittelten Mutation gekoppelt ist (KEAYS et al., 2007).

Die Kopplung zweier Loci im Genom wie z.B. von DNA-Markern und ursächlicher Mutation wird in Centi-Morgan (cM) angegeben. 1 cM ist dabei der Abstand zweier Loci auf einem Chromosom, in dem eine Rekombination in 100 Meiosen auftritt (SILVER, 1995).

3. ENU-induzierte Mausmodelle mit veränderter Nierenfunktion

Eine der beiden in dieser Arbeit untersuchten ENU-induzierten Mausmutanten (Linie HST001 = UREHD1) wurde anhand einer veränderten Nierenfunktion als Leitsymptom gezüchtet. Deshalb wurde die Mausphänotypdatenbank des Jackson Laboratory (<http://www.informatics.jax.org>) auf ENU-induzierte Linien untersucht, die eine veränderte

Nierenfunktion als Phänotyp aufwiesen. Die Recherche erbrachte 67 Einträge (Stand August 2010). Tabelle 2 listet davon 16 Linien auf, die in phänotyp-basierten ENU-Projekten primär aufgrund des abnormen Nierenphänotyps gezüchtet wurden. In acht dieser Linien wurde die ursächliche Mutation bereits identifiziert. Hierbei sind folgende Gene betroffen: *Aqp2* (aquaporin 2), *Bicc1* (bicaudal C homolog 1 [Drosophila]), *Nphp3* (nephronophthisis 3, [adolescent]), *Pkd1* (polycystic kidney disease 1 homolog), *Slc12a1* (solute carrier family 12, member 1), *Slc3a1* (solute carrier family 3, member 1) und *Umod* (uromodulin) (Tabelle 2).

Tabelle 2: ENU-induzierte Mausmodelle mit veränderter Nierenfunktion als Hauptsymptom zur Linienetablierung

Mutation (Symbolname, Art der Mutation, Auswirkung, Vererbung)	Chr	Nierenphänotyp	weitere Veränderungen	Referenz
Aqp2 ^{F204V} (= Aqp2 ^{ndi}) Punktmutation, As-Austausch, rezessiv	15	Hom (C57BL/6-Aqp2F204V): Reduzierte Harnosmolalität; hgrd. Hydronephrose (bereits im Alter von 4 Wochen; Verschlechterung mit zunehmendem Alter; Uretermorphologie ist normal, trotz Dilatation des Nierenbeckens); Polyurie; bei einer Behandlung mit 1-Deamino-8-D-Arginin-Vasopressin wird im Vergleich zu den Wildtypieren die Harnosmolalität proportional weniger erhöht	Hom (C57BL/6-Aqp2 ^{F204V}): Polydipsie	2
Bicc1 ^{m1Bdr} (= artemis) Punktmutation, As-Austausch, rezessiv	10	Hom (C57BL/6J-Bicc1m1Bdr): Vergrößerte, polyzystische Nieren; Plasmaharnstoff erhöht	Hom (C57BL/6J-Bicc1m1Bdr): Unfruchtbar; lebensfähig, obwohl einige Mäuse unerwartet sterben Het: Fruchtbar und lebensfähig	3
Nphp3 ^{pol} Punktmutation, As-Austausch, rezessiv	9	Hom (C57BL/6Apb-Nphp3pol/Apb): Vergrößerte, polyzystische Nieren bereits im juvenilen Alter (langsameres Fortschreiten); Nierenentzündung mit Fibrose; Plasmaharnstoff erhöht	Hom (C57BL/6Apb-Nphp3pol/Apb): Exencephalie; vorzeitiger Tod	4
Pkd1 ^{m1Bei} Punktmutation, As-Austausch, rezessiv	17	Hom (AJ * FVB/N): Polyzystische Nieren (bereits am Tag E18,5)	Hom (AJ * nFVB/N): Polyzystisches Pankreas; Hydrops fetalis	5
pru1 UN, UN, rezessiv	UN	Hom: Albuminurie	NA	1
pru2 UN, UN, rezessiv	UN	Hom: Albuminurie	NA	1
Rgsc1050 UN, UN, dominant	UN	Het (C57BL/6Jcl *nDBA/2Jcl): Nierenzellkarzinom, später Ausbruch	NA	6

Tabelle 2 Fortsetzung 1

Mutation (Symbolname, Art der Mutation, Auswirkung, Vererbung)	Chr	Nierenphänotyp	weitere Veränderungen	Referenz
Rnl11 UN, UN, UN	UN	C57BL/6J-Rnl11: Albuminurie	NA	9
Rnl20 UN, UN, UN	UN	C57BL/6J-Rnl20: Albuminurie	NA	10
Rnl5 UN, UN, UN	2	C57BL/6J-Rnl5/Pgn: Albuminurie	NA	11
Slc12a1 ^{1299F} (= Slc12a1 ^{UREHR3}) Punktmutation, As-Austausch, rezessiv	2	Hom (C3HeB/FeJ-Slc12a1I299F): 3 Monate alte Tiere: Polyurie; Plasmaharnstoff erhöht; Hyperprostaglandinurie; Fraktionelle Exkretion erhöht von Kalzium, Magnesium, erniedrigt von Harnstoff; 24h-Harnausscheidung erhöht von Kalzium, Magnesium, Kreatinin, Harnstoff, Natrium, Kalium, erniedrigt von Harnsäure; erhöhte Kreatinin-Clearance (bei männlichen Tieren); Harnosmolalität verringert (mit/ohne Durstversuch); Urin/Plasma-Verhältnis reduziert von Harnstoff, Harnsäure; Exkretion von Uromodulin im Harn erniedrigt; Hydronephrose; fokale Kalzifikation des Interstitiums und der epithelialen Tubulizellen; Pyelonephritis bis hin zum Nierenversagen und Harn besiedelt mit Bakterien (männliche Tiere)	Hom (C3HeB/FeJ-Slc12a1I299F): 3 Monate alte Tiere: Polydipsie; hypochlorämische metabolische Alkalose; Hypermagnesämie; Hyperkalzämie (weibliche Tiere); Plasmawerte erhöht von AP (weibliche Tiere), Nt-proANP; Hypotonie; Osteopenie; mittlerer arterieller, systolischer und diastolischer Blutdruck sind verringert	12
Slc3a1 ^{pbl} Punktmutation, As-Austausch, rezessiv	17	Hom (C3HeB/FeJ * MRL/MpJ): Urämie; Zystin-Kristallurie; Urolithiasis (Zystinierensteine) begünstigt durch erhöhte Konzentrationen von Lysin, Arginin, Ornithin im Urin; verringertes Nierengewicht; uni- oder bilaterale Erweiterung des Nierenbeckens; erweiterte Nierentubuli; veränderte Glomerulimorphologie	Hom (C3HeB/FeJ und C3HeB/FeJ * MRL/MpJ): Erhöhte Plasmawerte von AP, LDL und Cholesterol; reduziertes Körpergewicht (assoziiert mit verringerter Fettmasse und Knochendichte)	13

Tabelle 2 Fortsetzung 2

Mutation (Symbolname, Art der Mutation, Auswirkung, Vererbung)	Chr	Nierenphänotyp	weitere Veränderungen	Referenz
Umod ^{A227T} (= Umod ^{UREHR4}) Punktmutation, As-Austausch, rezessiv	7	Hom (C3HeB/FeJ-UmodA227T): 3–4 Monate alte Tiere: erhöhte Plasmapwerte von Harnstoff und Kreatinin; Polyurie; 24h-Harnausscheidung erhöht von Kalzium, verringert von Harnsäure; Harnosmolalität verringert (mit/ohne Durstversuch); Fraktionelle Exkretion verringert von Harnstoff und Harnsäure; Exkretion von Uromodulin im Harn erniedrigt; weitere Daten siehe (II.4.6.2.)	siehe (II.4.6.2.)	14, 15
UREHD1 Punktmutation, As-Austausch, dominant	7	Het (C3HeB/FeJ-UREHD1): Erhöhte Plasmapwerte von Harnstoff und Kreatinin; Polyurie; weitere Daten siehe diese Arbeit (IV.1.)	siehe Daten dieser Arbeit (IV.1.)	15
UREHR1 UN, UN, rezessiv	UN	Hom (C3HeB/FeJ-UREHR1): Erhöhte Plasmapwerte von Harnstoff und Kreatinin; Polyurie; Albuminurie; Harnkreatininexkretion ist verringert; Glomeruläre Hypertrophie; verdickte Kapillarwände	Hom (C3HeB/FeJ-UREHR1): Hypoglykämie; Hypercholesterinämie; verkürzte Lebensdauer von ca. 5 Monaten; Polydipsie; Aortenhypertrophie	15
UREHR2 UN, UN, rezessiv	UN	Hom (C3HeB/FeJ-UREHR2): Erhöhte Plasmapwerte von Harnstoff und Kreatinin; verkleinerte Nieren	Hom (C3HeB/FeJ-UREHR2): Hypoglykämie	15

As: Aminosäure; Chr: Chromosom; Het: heterozyote Mutanten; Hom: homozyote Mutanten; UN: unbekannt; NA: nicht angegeben; E: Tag der Trächtigkeit; AP: alkalische Phosphatase; Nt-proANP: N-terminalen Fragment vom pro-atrialen natriuretischen Peptid; LDL: Low Density Lipoprotein; h: Stunde; 1) (<http://www.informatics.jax.org/>) (Datenbank MGI, The Jackson Laboratory, Stand August 2010); 2) LLOYD et al. 2005; 3) http://mutagenetix.scripps.edu/phenotypic/phenotypic_rec.cfm?page=detail_item&pk=167; 4) <http://pb.apf.edu.au/phenbank/strain.html?id=63>; 5) HERRON et al., 2002; 6) <http://www.brc.riken.jp/lab/gsc/mouse/cgi-bin/mouse.cgi?NAME=M101050>; 7) <http://www.brc.riken.jp/lab/gsc/mouse/cgi-bin/mouse.cgi?NAME=M101324>; 8) <http://www.brc.riken.jp/lab/gsc/mouse/cgi-bin/mouse.cgi?NAME=M101328>; 9) <http://jaxmice.jax.org/strain/008791.html>; 10) <http://jaxmice.jax.org/strain/008794.html>; 11) <http://jaxmice.jax.org/strain/008785.html>; 12) KEMTER et al., 2010; 13) PETERS et al., 2009; 14) KEMTER et al., 2009; 15) AIGNER et al., 2007;

4. Uromodulin (Umod; Tamm-Horsfall Protein, THP)

In der Untersuchung dieser Arbeit wurde in der mutanten Linie HST001 (= UREHD1) die ursächliche Mutation im Gen Uromodulin (*Umod*) gefunden. Deshalb ist im Folgenden eine Literaturübersicht über dieses Gen dargestellt.

4.1. Aufbau und Funktion der Niere

Die Niere setzt sich aus dem Nierenparenchym (Nierenrinde und -mark) und dem Nierenbecken zusammen. Das Nephron (Abbildung 1) als funktionale Einheit der Niere besteht aus einem Nierenkörperchen (Glomerulum und Bowman-Kapsel) und dem dazugehörigem Tubulusapparat (proximaler, intermediärer und distaler Tubulus und Verbindungstubulus), der in das Sammelrohrsystem mündet. Die geraden Abschnitte des proximalen, intermediären und distalen Tubulus bilden die Henlesche Schleife (dünn absteigender, dünn aufsteigender und dick aufsteigender Schenkel) (VOLLMERHAUS, 1999; SINOWATZ, 2000).

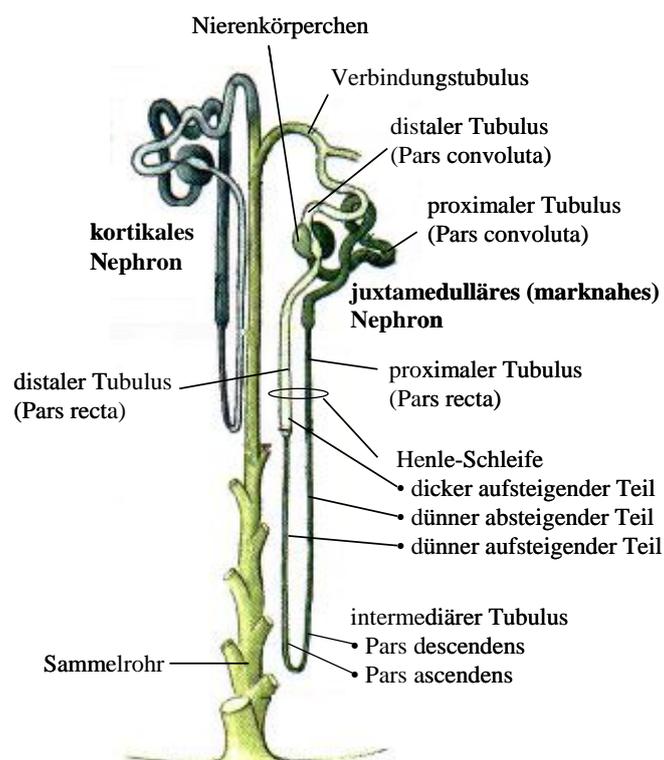


Abbildung 1: Aufbau des Nephrons mit Sammelrohr (abgeändert aus SILBERNAGL, 2010)

Allgemein besteht die Funktion der Nieren in der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen wie z.B. Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin, in der Aufrechterhaltung des Wasser-,

Elektrolyt- und des Säure-Basen-Haushalts und des osmotischen Druckes. Des Weiteren produzieren sie Hormone wie Erythropoetin und Calcitriol und sind mit dem Renin (Enzym)-Angiotensin-Aldosteron-System für die Blutdruckregulation von großer Bedeutung. Die Nieren übernehmen auch metabolische Aufgaben wie Gluconeogenese oder Abbau von Fettsäuren (SILBERNAGL, 2010).

Primärharn entsteht durch Filtration des Blutes in den Glomeruli. Er gleicht weitgehend dem Plasmawasser mit den darin gelösten Stoffen exklusive der Makromoleküle. Die Filtrierbarkeit hängt von der Molekülgröße und von der Ladung der Stoffe ab. Aus dem Primärharn werden durch tubuläre Rückresorption mittels Diffusion und unterschiedlicher Transportmechanismen bis zu 99 % des Wassers und essenzielle Stoffe wie Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , Glukose sowie Aminosäuren zurück gewonnen. Mehr als die Hälfte des Primärharns wird bereits in den proximalen Tubulusabschnitten rückresorbiert. Neben der Resorption (aktiv und/oder passiv) erfolgt im Nephron auch eine Sezernierung, z.B. von Wasserstoffionen, Ammoniumionen, Kalium oder Harnstoff. Harnstoff wird zum Teil proximal resorbiert, zum Teil in der Henleschen-Schleife wieder sezerniert und zum Teil im medullären Sammelrohr wieder resorbiert. Die Resorption von Harnstoff beträgt nicht mehr als 50 % des glomerulär filtrierte Harnstoffes. Kreatinin wiederum wird praktisch nicht rückresorbiert oder sezerniert. Deshalb entspricht die Kreatinin-Clearance der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Die fraktionelle Ausscheidung der Stoffe (= fraktionelle Exkretion, FE) mit dem Endharn wird von Tubulus und Sammelrohr gesteuert. Die FE errechnet sich wie folgt: $\text{FE} = \text{ausgeschiedene Menge pro Zeiteinheit} / \text{filtrierte Menge pro Zeiteinheit}$ (WEISS, 1999; SILBERNAGL, 2010).

4.2. Gen, Expression und Struktur von *UMOD*

Tamm und Horsfall isolierten vor über 60 Jahren ein Mukoprotein aus menschlichem Urin und zeigten, dass das Protein in der Lage war, die virale Hämagglutination zu inhibieren (TAMM & HORSFALL, 1950, 1952). Zu einem späteren Zeitpunkt wurde im Urin von schwangeren Frauen ein Glykoprotein entdeckt, das immunsuppressive Wirkung aufwies (MUCHMORE & DECKER, 1985) und als Uromodulin bezeichnet wurde. Später stellte sich durch Sequenzanalysen der cDNA heraus, dass es identisch mit dem Tamm-Horsfall Protein ist (HESSION et al., 1987; PENNICA et al., 1987). Das Uromodulin-Glykoprotein ist das am häufigsten vorkommende Protein im Säugerharn (GRANT & NEUBERGER, 1973).

Das *UMOD*-Gen beim Menschen (NCBI Accession-No. NC_000016.9, 19665 nt) ist auf Chromosom 16p12.3 lokalisiert. Nach der NCBI-Datenbank sind zwei Transkripte

(Transkript 1: NCBI Accession-No. NM_003361.2, 2327 nt; Transkript 2: NCBI Accession-No. NM_001008389.1, 2264 nt) mit je elf Exons und je 640 Aminosäuren beschrieben. Bei der Maus ist das Gen (NCBI Accession No. NC_000073.5, 16392 nt) auf Chromosom 7, 126,6 Mb lokalisiert und besitzt ein Transkript (NCBI Accession-No. NM_009470.4, 2472 nt) mit elf Exons und 642 Aminosäuren (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Umod>). Die mRNA wird nur in der Niere exprimiert (PENNICA et al., 1987). Das Gen kodiert das Protein Uromodulin, ein GPI (Glykosylphosphatidylinositol)-verankertes Glykoprotein (RINDLER et al., 1990), das ausschließlich in den Zellen des dicken aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife (TALH) synthetisiert wird, aber nicht in den Macula Densa-Zellen und den distalen, gewundenen Tubuli (BACHMANN et al., 1990). Zaucke et al. (2010) zeigten, dass Uromodulin in den Primärzilien der TALH-Tubuli exprimiert wird. Eine Publikation wies Uromodulin in Ependym-Zellen von Rattengehirnen nach (ZALC et al., 1984). Die Primärstruktur des Proteins wurde durch Sequenzanalysen der cDNA ermittelt (HESSION et al., 1987; PENNICA et al., 1987). Uromodulin besteht inklusive der *N*-terminalen Sequenz (Asp-Thr-Ser-Glu-Ala) aus 616 Aminosäuren, davon sind 48 Cysteine, die 24 Disulfidbrücken putativ ausbilden können (PENNICA et al., 1987). Des Weiteren besitzt das Protein acht potentielle *N*-Glykosilierungsstellen (SERAFINI-CESSI et al., 2003). Ca. 30 % des Molekulargewichtes von maturem Uromodulin-Protein ist auf den hohen Kohlehydratanteil zurückzuführen (MUCHMORE & DECKER, 1985), das zu einem komplexen, teils heterogen zusammengesetzten Glykokomplex zusammengebaut ist. So trägt z.B. die *N*-Glykosilierungsstelle Asn251 ein mannosereiches Kohlehydrat (SERAFINI-CESSI et al., 1984), das in der Lage ist, *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien des Fimbrien-Typs 1 spezifisch zu binden (PAK et al., 2001). Es gibt drei EGF (epidermal growth factor)-ähnliche Domänen, von denen zwei (cbEGF2 und cbEGF3) eine Kalzium-bindende Sequenz besitzen (DAHAN et al., 2003) und Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, eine ZP (Zona pellucida) Domäne, die für die Polymerisation von Uromodulin in die supramolekulare Struktur eines Filaments (JOVINE et al., 2002) wichtig ist und einen *C*-Terminus, bestehend aus einer Reihe von hydrophoben Aminosäuren. Die hydrophoben Abschnitte stellen ein Signal für die Transpeptidase des endoplasmatischen Retikulums (ER) dar. Nach Translation der Uromodulin-mRNA erfolgt die korrekte dreidimensionale Faltung (mit Ausbildung der Disulfidbrücken) und Modifikation (Abspaltung des Signalpeptids, Anhängen des GPI-Ankers, komplexe Glykosilierung) des Uromodulin-Proteins am ER und Golgiapparat. Reifes Uromodulin wird über den GPI-Anker an der luminalen Zellmembran der TALH-Zellen verankert, nach Spaltung der hydrophoben Peptidketten in das Lumen des Nierentubulus abgegeben und mit dem Harn ausgeschieden (SERAFINI-CESSI et al., 2003) (Abbildung 2).

kam, verlässt diese wieder durch Diffusion über basolaterale K^+ -Kanäle und neutralisiert dadurch die dortige Cl^- -Auswärtsdiffusion elektrisch (SILBERNAGL, 2010) (Abbildung 3).

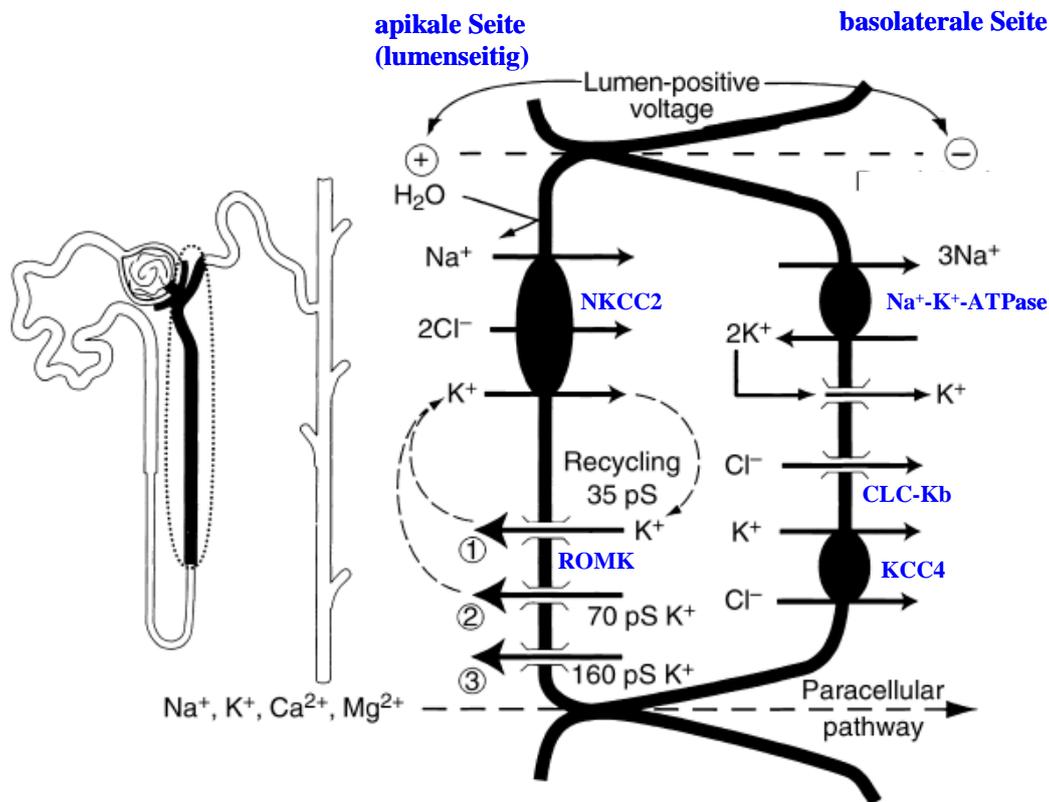


Abbildung 3: Ionenkanäle und Ionenbewegungen an einer Tubuluszelle im TALH (abgeändert aus GIEBISCH, 2001)

NKCC2: apikaler, elektroneutraler $Na^+-K^+-2Cl^-$ -Kotransporter; ROMK: apikaler K^+ -Kanal; CLC-Kb: basolateraler Cl^- -Kanal; KCC4: basolateraler K^+-Cl^- -Kotransporter-4; $Na^+-K^+-ATPase$: Na^+-K^+ -Pumpe.

4.4. Eigenschaften und klinische Relevanz von Uromodulin

Trotz intensiver Studien in den letzten 60 Jahren ist die Funktion von Uromodulin bisher weitgehend unklar. Es wird vermutet, dass es einen schützenden Effekt gegen bakteriell aufsteigende Harntraktinfektionen besitzt aufgrund der Fähigkeit, *E. coli* des Fimbrien-Typs 1 daran zu hindern, an der urothelialen Oberfläche zu binden (PAK et al., 2001; BATES et al., 2004; MO et al., 2004a). Harntraktinfektionen treten, besonders bei Frauen, häufig auf und werden zu 85 % von uropathogenen *E. coli*-Stämmen ausgelöst (FOXMAN, 2002). Die Uropathogenität hängt von den Adhäsinen ab, mit denen sich die Bakterien anheften können. Bei *E. coli*-Bakterien sind es die sogenannten Fimbrien der Typen 1 (Blasen- und Nierenepithelzellen; assoziiert mit Zystitis), P (Nierenepithelzellen; assoziiert mit Pyelonephritis), S/F1C (Blasen- und Nierenepithelzellen; assoziiert mit aufsteigenden Harntraktinfektionen) und Dr (Blasen- und Nierenepithelzellen; assoziiert mit Zystitis und Pyelonephritis) (MULVEY, 2002). Von den zahlreichen *E. coli*-Adhäsinen wird der

Fimbrien-Typ 1 (Subtyp H) aufgrund seiner Spezifität für den mannosilierten Uroplakin Ia (UPIa)-Rezeptor als sehr pathogen beschrieben (LANGERMANN et al., 1997; MULVEY, 2002). Uromodulin besitzt ein mannosereiches Kohlehydrat und kann somit vermutlich *E. coli* des Fimbrien-Typs 1 binden und dadurch die Anheftung der Bakterien an den UPIa-Rezeptor des Urothels hemmen (PAK et al., 2001).

Weiterhin wird vermutet, dass Uromodulin als Schutzfaktor gegen Urolithiasis beteiligt ist, indem es die Kristallbildung im Urin hemmt. Die Kristallisierung verläuft von einer Übersättigung des Urins über die Nukleation und Aggregation bis zum Wachstum der Kristalle (WORCESTER, 1994). Kalziumoxalat ist Bestandteil der häufigsten Nierensteine, die oft aufgrund der Übersättigung des Urins mit diesen Salzen auftreten (COE et al., 1992). Es gibt einige Urinmakromoleküle, die die Kristallbildung *in vitro* hemmen können (WESSON et al., 1998). Uromodulin soll hierbei eine Rolle spielen, doch ist unklar, ob Uromodulin *in vivo* die Kristallbildung hemmt oder fördert (WORCESTER, 1994). Dies hängt von der Salzkonzentration und vom pH ab. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Uromodulin bei einem pH-Wert von 7,2 und geringen Ionenkonzentrationen bzw. unter Bedingungen eines physiologischen Urins die Kristallbildung von Kalziumoxalat hemmt und bei einem pH-Wert von 5,7 und hohen Ionenkonzentrationen eine herabgesetzte Hemmung der Kristallbildung auftritt (HESS et al., 1989). Dies ist bedingt durch eine gesteigerte Selbstaggregation von Uromodulin, die wahrscheinlich zur Herabsetzung der Interaktion von Uromodulin mit Kalziumoxalatkristallen führt (HESS et al., 1991). Von weiteren Forschergruppen wurde berichtet, dass Uromodulin *in vitro* (CHEN et al., 2001b) und *in vivo* (MO et al., 2004b; MO et al., 2007) Kalziumoxalat daran hindert, zu kristallisieren, so dass es einen Schutz gegen Urolithiasis darstellt.

Aufgrund der Fähigkeit, dendritische Zellen über den Toll-like-Rezeptor 4 zu aktivieren, wird vermutet, dass Uromodulin an der angeborenen Immunantwort beteiligt ist (SAEMANN et al., 2005). Uromodulin könnte aber auch eine immunsuppressive Funktion haben, worauf *in vitro*-Untersuchungen hindeuten, in denen es durch die glykosilierten Seitenketten rekombinanten Tumor-Nekrose-Faktor (rTNF) und rekombinantes Interleukin-1 (rIL-1) bindet (HESSION et al., 1987; MUCHMORE et al., 1987; SHERBLOM et al., 1988) und die antigenspezifische Lymphozytenproliferation hemmt (MUCHMORE et al., 1987; SHERBLOM et al., 1988).

Weiter wird berichtet, dass Uromodulin einen antioxidativen Effekt besitzt aufgrund der Fähigkeit, die Reaktion zwischen der Xanthinoxidase und Xanthin zu hemmen (CHEN et al.,

2001a). Xanthinoxidase katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure in der Niere und Leber.

4.5. Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankungen beim Menschen

Beim Menschen sind autosomal dominant vererbare Krankheiten beschrieben, die durch das Auftreten von Hyperurikämie, Gicht, Beeinträchtigung der Harnkonzentrierungsfähigkeit, progressives Nierenversagen, pathologische Veränderungen der Nieren wie tubulointerstitielle Nephritis, Zysten und interstitielle Fibrose (HART et al., 2002; DAHAN et al., 2003; RAMPOLDI et al., 2003; SCOLARI et al., 2004) und zum Teil durch renale Hypoplasie und vesikouretralen Reflux (WOLF et al., 2007) charakterisiert sind. Die Krankheiten wurden mit Mutationen im *UMOD*-Gen assoziiert und als „Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankungen“ (UAKD) bezeichnet. Die klinischen Ausprägungen innerhalb der betroffenen Familien sind, unabhängig von Art und Lage der Mutation, unterschiedlich.

Zu UAKD gehören die medullär-zystische Nierenerkrankung Typ 2 (MCKD2; OMIM #603860), die familiär juvenile hyperurikämische Nephropathie (FJHN; OMIM #162000) und die glomerulozystische Nierenerkrankung (GCKD; OMIM #609886).

Bei MCKD2 und FJHN sind die wichtigsten Symptome Nierenversagen, Hyperurikämie, Gicht und Nierenzysten. Die beiden Krankheiten wurden klinisch bisher aufgrund der Symptome voneinander abgegrenzt. Bei Auftreten medullärer Zysten wurden die Betroffenen der MCKD2 zugeordnet und bei Hyperurikämie der FJHN. Allerdings ist eine Differenzierung aufgrund der Symptome schwer durchzuführen (SCOLARI et al., 2004), da es bei beiden Erkrankungen zu Überschneidungen der klinischen Ausprägungen kommt (HART et al., 2002). Scolari et al. (2004) berichteten in ihrer Literaturübersicht von 31 verschiedenen *UMOD*-Mutationen bei MCKD2 und FJHN (HART et al., 2002; BLEYER et al., 2003a; BLEYER et al., 2003b; DAHAN et al., 2003; RAMPOLDI et al., 2003; TURNER et al., 2003; WOLF et al., 2003; KUDO et al., 2004; REZENDE-LIMA et al., 2004). 14 dieser Mutationen liegen in einer EGF-ähnlichen Domäne. Die 17 restlichen Mutationen treten in einer hochkonservierten Proteinregion (As 149–280) auf. Die klinischen Symptome dieser beiden Klassen von Mutationen sind ähnlich. So zeigen von 53 Patienten mit der Mutation in einer der EGF-ähnlichen Domänen 77 % chronisches Nierenversagen, 81 % Hyperurikämie mit Gicht und 19 % renale Zysten. Im Vergleich dazu wurde bei 73 % von 152 Patienten mit einer Mutation in der hochkonservierten Proteinregion (As 149–280) chronisches Nierenversagen festgestellt, 66 % hatten Hyperurikämie mit Gicht und 12 % renale Zysten. Folglich wurde vorgeschlagen, MCKD2/FJHN als einen Krankheitskomplex zu sehen

(DAHAN et al., 2001; KOTANKO et al., 2002; BLEYER et al., 2003a; SCOLARI et al., 2004).

Calado et al. (2005) entdeckten in Exon 5 von *UMOD* eine weitere Mutation, die für FJHN verantwortlich ist. Bei zwei Patienten mit MCKD2 entdeckten Wolf et al. (2007) eine *UMOD*-Mutation, bei der die Träger auch Symptome angeborener Anomalien der Nieren und des Harntraktes (congenital anomalies of the kidney and the urinary tract, CAKUT) wie renale Hypoplasie und vesikouretralen Reflux zeigten. In einer darauffolgenden Untersuchung von 96 Patienten mit CAKUT wurde keine weitere *UMOD*-Mutation gefunden (WOLF et al., 2009).

Neben der MCKD2 und der FJHN tritt die seltene glomeruläre Nierenerkrankung (GCKD) auf, die charakterisiert ist durch glomeruläre Zysten, verursacht durch eine Dilatation des Bowman'schen Zwischenraums (SHARP et al., 1997). Die familiäre GCKD kann mit einer Hypoplasie, aber auch mit normal großen Nieren auftreten. Als inkonstant auftretendes Symptom ist Hyperurikämie infolge einer geringen fraktionellen Ausscheidung von Harnsäure und einer hochgradigen Beeinträchtigung der Harnkonzentrationsfähigkeit festzustellen, was in ähnlicher Weise bei MCKD/FJHN in Erscheinung tritt (GUSMANO et al., 2002). Anfangs wurde GCKD - in Erscheinung getreten durch hypoplastische Nieren und früh auftretenden Diabetes (maturity-onset diabetes of the young type 5, MODY5) - assoziiert mit Mutationen des Gens *HNF-1 β* (hepatocyte nuclear factor-1 β) (BINGHAM et al., 2001). Rampoldi et al. (2003) entdeckten erstmals bei einer GCKD-Familie eine Mutation mit Aminosäureaustausch (C315R) im *UMOD*-Gen. Der Cystein zu Arginin-Austausch liegt in einer cbEGF-ähnlichen Domäne, wo bereits andere *UMOD*-Mutationen bei Patienten mit MCKD2/FJHN gefunden wurden. Gleichzeitig stellten die Autoren fest, dass sich bei MCKD2/FJHN und GCKD zwei klinische Symptome bei den meisten der untersuchten Patienten überschneiden: 1. Beeinträchtigung der Harnkonzentrationsfähigkeit und 2. erhöhte Harnsäurewerte im Serum (RAMPOLDI et al., 2003). Wahrscheinlich ist, dass Mutationen sowohl in *HNF-1 β* als auch in *UMOD* das klinische Bild der GCKD auslösen können (SCOLARI et al., 2004). Benetti et al. (2009) entdeckten eine weitere neue Mutation mit Aminosäureaustausch in Exon 4 innerhalb der ersten EGF-ähnlichen Domäne von *UMOD* in einem Patienten mit glomerulären und tubulären Zysten. Diese Ergebnisse, die sich nicht mit MCKD2 und FJHN decken, sind vergleichbar mit der von Rampoldi et al. (2003) beschriebenen GCKD-Familie.

Die publizierten Daten zeigen, dass eine klinische Korrelation zwischen den unterschiedlichen *UMOD*-Mutationen und bestimmten klinischen Symptomen nicht gezogen werden kann, so

dass vorgeschlagen wurde, die Erkrankungen MCKD2, FJHN und GCKD unter dem Begriff „Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankungen“ zusammenzufassen, wenn eine Mutation im *UMOD*-Gen nachgewiesen ist (BLEYER et al., 2004; SCOLARI et al., 2004). In einer weiteren Veröffentlichung mit sieben neuen *UMOD*-Mutationen ordnen die Autoren Uromodulin aufgrund der abweichenden Ziliarexpression in die Gruppe der Zystenproteine ein (ZAUCKE et al., 2010), da Mutationen von einigen Genen, die in Primärzilien exprimiert werden, zu zystischen Nierenerkrankungen führen (HILDEBRANDT & OTTO, 2005).

4.6. Uromodulin-mutante Mausmodelle

Für Uromodulin sind bisher zwei verschiedene Knockout-Mauslinien - *Umod*^{tm1Kuma} (BATES et al., 2004) und *Umod*^{tm1Xrw} (MO et al., 2004a) -, eine mutante Mauslinie mit einer Punktmutation (*Umod*^{A227T}) (KEMTER et al., 2009) (<http://www.informatics.jax.org/>), eine transgene Mauslinie mit der additiven Expression eines humanen mutanten Uromodulin-Proteins (C148W) (TAKIUE et al., 2008a) und eine transgene Mauslinie mit der additiven Expression eines mutanten Proteins (Tg^{UmodC147W}) (BERNASCONE et al., 2010) publiziert.

4.6.1. Knockout-Mäuse

Zur Erstellung beider Knockout-Mauslinien wurde die Methode des „Gene targeting“ durch homologe Rekombination von Gensequenzen in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) verwendet. Nach dem Einbringen der entsprechenden Mutation wurden durch Blastozysteninjektion der gentechnisch veränderten ES-Zellen mutante Mäuse erstellt.

Umod^{tm1Kuma}

Die Knockout-Mauslinie *Umod*^{tm1Kuma} beruht auf der Inaktivierung des *Umod*-Gens durch die Unterbrechung der kodierenden Sequenz in Exon 2 mittels einer Neomycin-Kassette (BATES et al., 2004). Untersuchungen bei homozygoten Knockout-Mäusen (*Umod*^{-/-}) (= *Umod*^{tm1Kuma}/*Umod*^{tm1Kuma}) ergaben, dass Wachstum und Fertilität der Mäuse normal sind, ebenso wie Serumelektrolyte, Harnstatus und Nieren bei makroskopischer und histologischer Untersuchung. Sie zeigten keine Anzeichen einer Nierenbeckenentzündung (BATES et al., 2004; BACHMANN et al., 2005).

Umod^{tm1Xrw}

Die Knockout-Mauslinie *Umod*^{tm1Xrw} beruht auf der Inaktivierung des *Umod*-Gens durch den Austausch der proximalen Promoterregion (650 bp) und der Exons 1–4 gegen eine Neomycin-Kassette (MO et al., 2004a). Untersuchungen bei homozygoten Knockout-Mäusen (*Umod*^{-/-}) (= *Umod*^{tm1Xrw}/*Umod*^{tm1Xrw}) im Vergleich zu Wildtypkontrolltieren (*Umod*^{+/+}) ergaben, dass bei den *Umod*^{-/-}-Mäusen keine Veränderungen im Wachstum, im Aktivitätsverhalten bzw.

generellem Verhalten, im Stoffwechsel und in der Fertilität auftraten (MO et al., 2007). Die Nieren dieser Tiere waren histologisch unverändert (MO et al., 2007; EL-ACHKAR et al., 2008), ebenso zeigte das Serumkreatinin keine Veränderungen (EL-ACHKAR et al., 2008).

Untersuchung nach *E. coli*-Infektionen des Harntraktes

Die Anfälligkeit für Harntraktsinfektionen wurde mit *E. coli*-Stämmen des Fimbrien-Typs 1 oder P erforscht. Untersuchungen an homozygoten *Umod*^{-/-}-Mäusen (*Umod*^{tm1Kuma}/*Umod*^{tm1Kuma}) nach Beimpfung der Harnblase mit *E. coli*-Bakterien des Fimbrien-Typs 1 ergaben, dass im Vergleich zu *Umod*^{+/+}-Kontrolltieren bei *Umod*^{-/-}-Mäusen eine signifikant stärkere Kolonisation der Harnblase und Schwierigkeiten bei der Bekämpfung der Bakterien auftraten. Das Blasengewebe war histologisch unverändert. Bei Beimpfung der Harnblasen mit *E. coli*-Bakterien des Fimbrien-Typs P war kein Befall der Nieren mit Bakterien zu erkennen, hinsichtlich des Fimbrien-Typs 1 gab es darüber keine Untersuchung (BATES et al., 2004).

Untersuchungen bei *Umod*^{-/-}-Mäusen (*Umod*^{tm1Xrw}/*Umod*^{tm1Xrw}) mit Beimpfung der Harnblase von *Umod*^{-/-}- und *Umod*^{+/+}-Mäusen mittels *E. coli*-Stämmen des Fimbrien-Typs 1 (Fimbrien-Subtyp H; funktionstüchtig) ergaben, dass die Harnblase in beiden Mausgruppen befallen wurde. Die Größenordnung der Kolonisation hing von der Anzahl der eingesetzten Bakterien ab. Bei unphysiologisch hoher Anzahl ($\geq 10^7$) war die Kolonisation nahezu identisch, während bei physiologischen Bedingungen ($\leq 10^5$) die Harnblase von *Umod*^{-/-}-Mäusen signifikant stärker befallen wurde. Die Beimpfung der Harnblasen mit *E. coli*-Stämmen des Fimbrien-Typs 1 mit einem nicht funktionstüchtigen Fimbrien-Subtyp H ergab bei beiden Mausgruppen keine Kolonisation, ebenso die Beimpfung mit *E. coli*-Stämmen des Fimbrien-Typs P (MO et al., 2004a).

Die Untersuchungen in den beiden Knockoutmauslinien ließen den Schluss zu, dass Uromodulin einen schützenden Effekt bei Harntraktsinfektionen hat (BATES et al., 2004; MO et al., 2004a).

Untersuchung von Urinexkretion und Harnkonzentrierungsfähigkeit

Die regulatorische Aufgabe von Uromodulin bei der Homeostase des Salz- und Wasserhaushaltes wurde in Harnstudien untersucht. Im Vergleich zu *Umod*^{+/+}-Mäusen waren bei *Umod*^{-/-}-Mäusen (*Umod*^{tm1Kuma}/*Umod*^{tm1Kuma}) die Wasseraufnahme und die Urinparameter bei freiem Zugang zu Wasser mit oder ohne Saccharose (Urinvolumen, osmolare Exkretion und die Urinexkretion von Natrium, Kalium, Chlorid, Kreatinin und Harnsäure) bis auf die Kreatinin-Clearance nicht signifikant verändert. Letztere war um 63 % erniedrigt. Unter

Wasserentzug konnten *Umod*^{-/-}-Mäuse den Harn nicht in der Weise konzentrieren wie *Umod*^{+/+}-Mäuse, d.h. sie schieden im Vergleich mehr Harn aus, allerdings ohne signifikant erhöhten Elektrolytverlust. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse wurde von einer Harnkonzentrationsstörung ausgegangen (BACHMANN et al., 2005).

Bei den anderen *Umod*^{-/-}-Mäusen (*Umod*^{tm1Xrw/Umod}^{tm1Xrw}) waren im Vergleich zu den *Umod*^{+/+}-Tieren die Urinkonzentrationen von Natrium, Chlorid, Phosphat, Kalium und Kalziumphosphat signifikant erhöht. Die Urinkonzentrationen von Kalzium, Magnesium, Zitrat und Kreatinin waren unverändert (MO et al., 2007).

Untersuchung von Ionen transportern/Kanälen und parakrinen/endokrinen Komponenten des juxtaglomerulären Apparats in der Niere

Um die Bedeutung von Uromodulin im Zusammenhang mit der Funktion von Nierentransportern/Kanälen und der regulatorischen Systeme unter Steady-State-Bedingungen zu analysieren, wurden bio- und histochemische Untersuchungen durchgeführt. Bei *Umod*^{-/-}-Mäusen (*Umod*^{tm1Kuma/Umod}^{tm1Kuma}) zeigte sich im Vergleich zu *Umod*^{+/+}-Mäusen eine Hochregulation der mRNA-Expression von distalen Nierentransportern wie z.B. NKCC2, ROMK, Na⁺-K⁺-ATPase, wohingegen die mRNA-Expression von parakrinen/endokrinen Komponenten des juxtaglomerulären Apparats (Cyclooxygenase-2 und Renin) signifikant reduziert war. Daher wurde vermutet, dass Uromodulin für regulatorische Transportmechanismen in der Niere von Bedeutung sein könnte (BACHMANN et al., 2005).

Analyse von Kalziumablagerungen und -steinen in der Niere und der Hemmung der Anheftung von Kristallen an kultivierten Epithelzellen

Es wurde der Schutzeffekt von Uromodulin gegen Nierensteinbildung untersucht. Bei 14 % der *Umod*^{-/-}-Mäuse (*Umod*^{tm1Xrw/Umod}^{tm1Xrw}) entwickelten sich spontan Kalziumkristalle in der Nierenpapille, was bei *Umod*^{+/+}-Mäusen nicht festgestellt wurde. In vitro wurde gezeigt, dass es im Urin von *Umod*^{-/-}-Mäusen zu einer 2fach erhöhten Kristallanheftung an Epithelzellen kam. Anders als die *Umod*^{+/+}-Kontrolltiere entwickelten 71 % der *Umod*^{-/-}-Mäuse unter Hyperoxalurie-Bedingungen eine Nierenkalzinose, eine moderate Kalziumkristallurie und Nierensteine (MO et al., 2007). Sie bildeten unter Hyperoxalurie- und Hyperkalzurie-Bedingungen die höchste Anzahl von Nierenkristallen im Bereich des TALH, dem Expressionsort von Uromodulin, während *Umod*^{+/+}-Mäuse keine Kristalle bildeten. Diese Studie bestätigte somit, dass Uromodulin ein starker Inhibitor der Kalziumkristallbildung ist (MO et al., 2004b).

Untersuchung bei Modellen der renalen Ischämie-Reperfusionserkrankungen (IRI)

Des Weiteren wurde untersucht, ob Uromodulin Auswirkungen bei renaler IRI hat. *Umod*^{-/-}-Mäuse (*Umod*^{tm1Xrw/Umod}^{tm1Xrw}) entwickelten im Vergleich zu *Umod*^{+/+}-Mäusen nach IRI aufgrund hochgradiger Entzündung und tubulärer Nekrose funktionell und histologisch stärker ausgeprägte Nierenschädigungen. Ferner kam es nach geringgradiger IRI nur bei *Umod*^{-/-}-Mäusen zu signifikanter Zylinderbildung, während bei hochgradiger IRI sowohl die *Umod*^{-/-}-Tiere als auch die *Umod*^{+/+}-Mäuse intratubuläre Zylinderbildung aufwiesen. Uromodulin besitzt somit einen schützenden Effekt nach IRI und ist nicht für die Zylinderbildung verantwortlich. Die Zylinderbildung hängt daher von dem Umfang einer Verletzung ab und nicht von der Anwesenheit von Uromodulin (EL-ACHKAR et al., 2008).

4.6.2. *Umod*^{A227T} mutante Mauslinie

Die mutante Mauslinie *Umod*^{A227T} stammt aus dem Münchener ENU-Mausmutageneseprojekt und trägt eine Punktmutation im Uromodulin-Gen in Exon 3 von G zu A (nt 871) (NM_009470), die zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin auf Position 227 (A227T) führt. Die Punktmutation liegt in einer hochkonservierten Region, in der zahlreiche *UMOD*-Mutationen beim Menschen identifiziert wurden (KEMTER et al., 2009).

Phänotyp *Umod*^{A227T} homozygot mutanter Mäuse

Zwei Wochen alte homozygote Mutanten zeigten hinsichtlich der Plasmakreatinin und -harnstoffkonzentration keinen signifikanten Unterschied zu den Wildtyptieren. Doch im Alter von vier Monaten zeigten homozygote Mutanten beider Geschlechter im Vergleich zu den Wildtyptieren signifikant erhöhte Plasmawerte von Kreatinin und Harnstoff und signifikant erniedrigte Triglycerid-Plasmakonzentrationen. Bei den männlichen Tieren waren ferner die Plasmakalziumkonzentration sowie die Plasmaaktivitäten von Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST) und alkalischer Phosphatase (AP) signifikant erhöht, und die Plasmakonzentrationen von Cholesterol und nicht veresterten Fettsäuren (non-esterified fatty acids, NEFA) signifikant erniedrigt. Bei weiblichen homozygot mutanten Tieren waren die Plasmakonzentrationen von Kalium, Magnesium und Harnsäure signifikant erhöht. Die Plasmakonzentration des N-terminalen Fragments vom pro-atrialen natriuretischen Peptid (Nt-proANP) war bei homozygoten Mutanten tendenziell erhöht. Blutdruck und Herzfrequenz homozygot mutanter Tiere wiesen keine Unterschiede zu denen von Wildtyp-Wurfgeschwistern auf.

Eine 1,5fache Erhöhung des täglich ausgeschiedenen Harnvolumens bei gleichzeitig signifikant erniedrigter Harnosmolalität und eine 3fache Steigerung der Urinexkretion von

Kalzium pro Zeiteinheit wurden bei Untersuchungen der Nierenfunktion bei drei bis vier Monate alten homozygoten Mutanten beider Geschlechter im Vergleich zu den Wildtyptieren nachgewiesen. Des Weiteren war die tägliche Ausscheidung von Natrium, Kalium, Chlorid, Magnesium, Kreatinin und Harnstoff mit dem Urin bei männlichen homozygoten Mutanten signifikant erhöht. Signifikant erniedrigt bei beiden Geschlechtern war die Harnausscheidung von Harnsäure. Das Urin/Plasma-Verhältnis (U/P) von Harnstoff und Harnsäure war nicht nur signifikant, wie bei Natrium und Kalium, sondern sogar 2–3fach reduziert. Des Weiteren wurde eine signifikant reduzierte fraktionelle Exkretion (FE) von Harnstoff und Harnsäure festgestellt. Die FE von Natrium und Kalium war bei beiden Geschlechtern unverändert. Die Ausscheidung von Uromodulin mit dem Harn war bei homozygoten Mutanten beider Geschlechter stark reduziert. Die Harnkonzentrationsstörung homozygot mutanter Tiere blieb auch bei Wasserentzug bestehen. So wiesen diese Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern nach Wasserentzug ein um 40 % erhöhtes Urinvolumen bei gleichzeitig signifikant reduzierter Harnosmolalität auf.

Neben Veränderungen der Parameter der Nierenfunktion wurden bei homozygot *Umod*^{A227T} mutanten Tieren extrarenale Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern festgestellt. Bei adulten homozygot mutanten Mäusen beider Geschlechter wurden ein reduziertes Körpergewicht und deutlich verringerte Werte für Fettmasse und Fettgehalt (= Prozent Körperfett) festgestellt. Während die absoluten Organgewichte reduziert waren, wurde bei den relativen Organgewichten kein Genotyp-Unterschied festgestellt. Des Weiteren wurden Veränderungen im Energiestoffwechsel nachgewiesen. Homozygot mutante Tiere wiesen eine reduzierte Stoffwechselrate (minimale Stoffwechselrate als auch mittlere Stoffwechselrate über 21 Stunden) und eine signifikant reduzierte Körpertemperatur auf. Um die Knochenveränderungen als Langzeitfolge der Hyperkalziurie aufzuklären, wurde das Skelett bei vier Monate alten Tieren analysiert. Mutante Tiere wiesen eine signifikant reduzierte Knochendichte und einen deutlich reduzierten Knochengehalt auf, was als Anzeichen von Osteopenie gilt. Bei sechs Monate alten männlichen homozygoten Mäusen waren der gesamte und der kortikale Knochengehalt an der distalen Metaphyse und Diaphyse des Femurs und die gesamte, trabekuläre und kortikale Knochendichte an der Diaphyse des Femurs signifikant reduziert. Die weiblichen Tiere tendierten zu analogen Veränderungen.

Die Nieren von drei bis sechs Monate alten homozygoten Mutanten beider Geschlechter waren makroskopisch und lichtmikroskopisch unauffällig, wiesen allerdings deutliche Unterschiede beim immunhistochemischen Färbemuster beim Nachweis von Uromodulin auf. So wurde bei Wildtyptieren in TALH-Zellen der Niere Uromodulin betont an der luminalen

Zellmembran detektiert. Dagegen wurde in TALH-Zellen homozygot mutanter Tiere ein zytoplasmatisches perinukleäres Uromodulin-Markierungsmuster nachgewiesen, bei gleichzeitig höherer Färbintensität der Uromodulin-Markierung als in TALH-Zellen von Wildtyptieren. In ultrastrukturellen Untersuchungen wurden in TALH-Zellen homozygot mutanter Tiere perinukleär lokalisierte lamelläre gestapelte membranartige Strukturen nachgewiesen, die multifokal mit Granula des ER assoziiert waren. Diese Strukturen wurden als Ausdruck eines hyperplastischen ER interpretiert.

Phänotyp *Umod*^{A227T} heterozygot mutanter Mäuse

Die Blut- und Kreislaufdaten der heterozygot mutanten Tiere ähnelten im Vergleich zu den Wildtyptieren meist denen der homozygoten Tiere, jedoch waren die Veränderungen meist weniger deutlich ausgeprägt. So waren bei männlichen Mutanten die Plasmawerte von Kreatinin und Harnstoff signifikant erhöht, und die für Phosphat, Cholesterol, Triglyceride und NEFA signifikant reduziert. Bei weiblichen Mutanten waren Kalium, Kreatinin und Harnstoff signifikant erhöht und Cholesterol signifikant reduziert. Es wurden keine Veränderungen bei Blutdruck und Herzfrequenz festgestellt. Plasmakreatinin und -harnstoff bei zwei Wochen alten Mäusen waren unverändert.

Die Parameter zur Messung der Nierenfunktion wiesen bei heterozygot mutanten Tieren, im Gegensatz zu homozygot mutanten Wurfgeschwistern, im Vergleich zu denen der Wildtyptiere keine signifikanten Unterschiede auf. Als Ausnahme war die Ausscheidung der Kalziummenge mit dem Harn bei weiblichen Tieren signifikant erhöht.

Die Untersuchungen von Morphologie, Stoffwechsel und Skelett zeigten vergleichsweise zu den Wildtypkontrolltieren meist ähnliche Veränderungen wie die der homozygot mutanten Tiere. Das Körpergewicht war etwas weniger reduziert als bei den homozygoten Mutanten und bzgl. der Stoffwechselrate zeigten die heterozygot mutanten Tiere einen intermediären Phänotyp zwischen den Wildtyptieren und homozygoten Mutanten. Die Reduktion der Knochendichte und des Knochengehalts war ebenfalls weniger ausgeprägt als bei den homozygot mutanten Tieren.

Hinsichtlich der pathologischen Befunde in den Nieren wurden keine Angaben gemacht.

Obwohl die Nierenfunktion heterozygot *Umod*^{A227T}-mutanter Tiere nicht beeinträchtigt war, wiesen diese Tiere im Vergleich zu gleichgeschlechtlichen Wildtyp-Wurfgeschwistern einen veränderten Phänotyp hinsichtlich des Energiestoffwechsels (Hauptparameter: Körpergewicht, Energiestoffwechselrate) auf. Aus diesem Grund wurde *Umod*^{A227T} als eine dominante Mutation eingestuft (KEMTER et al., 2009).

4.6.3. Transgene Mauslinie mit humanem mutantem *UMOD* (C148W)

Die transgene Mauslinie mit dem humanen mutanten *UMOD* (C148W) wurde durch zufällige Integration eines Genkonstruktes erstellt, das die humane *UMOD*-cDNA mit der Punktmutation T444G enthielt (TAKIUE et al., 2008a; TAKIUE et al., 2008b). Die Mutation *UMOD*^{C148W} wurde bei Patienten mit UAKD nachgewiesen (RAMPOLDI et al., 2003).

Hemizygot transgene (Tg) Mäuse exprimierten sowohl das endogene murine als auch das humane mutante Uromodulin-Protein in der Niere. Die Expression des Transgens erfolgte ausschließlich in den Nephron-Abschnitten, in welchen das endogene murine Uromodulin synthetisiert wurde. Die Wildtypkontrolltiere exprimierten nur das murine Uromodulin (TAKIUE et al., 2008a). Hinsichtlich der Höhe der Transgen-Expression in Korrelation zu der Expression von dem endogenen murinen Uromodulin wurden keine Angaben gemacht. In immunhistochemischen Untersuchungen zum Nachweis von Uromodulin-Protein, bei welchen nicht zwischen humanen und murinen Ursprung des Proteins differenziert wurde, wurde bei transgenen Tieren ein ähnliches, jedoch intensiveres Uromodulin-Färbemuster als bei Wildtypkontrolltieren festgestellt. Den Autoren erschien es, als sei das Uromodulin-Protein in Nieren transgener Mäuse in einer „aggregierten Form“ vorhanden. Im Rahmen der Untersuchung der Nierenfunktion wurde kein Unterschied der Harnkonzentrierungsfähigkeit der Nieren und der Kreatinin-Clearance zwischen Tg-Mäusen und Wildtypkontrolltieren festgestellt. Des Weiteren zeigte sich kein Unterschied bei der mit dem Harn ausgeschiedenen Uromodulin-Menge zwischen beiden Gruppen. Das von Tg-Mäusen mit dem Harn ausgeschiedene Uromodulin wurde als das murine Protein identifiziert. Dagegen konnte das humane Uromodulin-Protein nicht nachgewiesen werden (TAKIUE et al., 2008b).

4.6.4. Tg^{UmodC147W} transgene Mauslinie

Die transgene Mauslinie Tg^{UmodC147W} wurde durch additiven Gentransfer eines mutanten *Umod*-Konstruktes erstellt, das die Mutation C147W (Aminosäureaustausch von Cystein zu Tryptophan auf Position 147, die eine Disulfidbrücke ausbildet) trägt. Die Mutation liegt in der EGF-ähnlichen Domäne III und entspricht der C148W-Mutation beim Menschen (RAMPOLDI et al., 2003). Transgene Tiere bilden sowohl das endogene Wildtyp-Uromodulin als auch das transgene Uromodulin mit der Mutation. Zur Kontrolle wurde eine weitere transgene Linie mit dem *Umod*-Konstrukt ohne die Mutation C147W erstellt (Linie Tg^{Umodwt}). Die transgenen Tiere beider Linien zeigen keine offensichtlichen phänotypischen Unterschiede zu den nicht transgenen Kontrolltieren. Sie sind lebensfähig und haben den Habitus einer gesunden Maus (BERNASCONE et al., 2010).

$Tg^{UmodC147W}$ vs. Tg^{Umodwt}

In transgenen Tieren der Linie $Tg^{UmodC147W}$ ist der Uromodulin-Transport verändert, was durch die basolaterale Anreicherung und die luminal Abwesenheit des Uromodulins gezeigt wurde. Des Weiteren wurde in der Niere signifikant mehr Uromodulin gefunden, insbesondere im Zytoplasma eines Großteils der TALH-Tubuli. Die Urinexkretion von Uromodulin war erheblich herabgesetzt. $Tg^{UmodC147W}$ -Mäuse traten durch Polyurie, Polydipsie, gesteigerte Plasmaosmolalität, erhöhten Plasmaharnstoff und -kreatinin sowie erhöhte Exkretion von Kalzium mit dem Urin in Erscheinung, und sie besaßen unter Wasserentzug eine herabgesetzte Harnkonzentrierungsfähigkeit mit verminderter Harnosmolalität und höherem Urinvolumen. Ferner waren pathologische Veränderungen der Nieren festzustellen, wie tubulointerstitielle Fibrose mit entzündlicher Zellinfiltration, tubuläre Dilatation und tubuläre Zysten bis hin zur TALH-Zellzerstörung (BERNASCONE et al., 2010).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Tiere und Tierzucht

1.1. Tierhaltung

Zucht und Haltung der Tiere erfolgten im Tierstall des Moorversuchsgutes Oberschleißheim unter spezifiziert pathogen-freien (SPF) Bedingungen. Die Raumtemperatur betrug $22 \pm 2^\circ\text{C}$ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50–60 % und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je zwölf Stunden (7 bis 19 Uhr hell). Die Mäuse wurden in Typ II-Käfigen (U-TempTM Polyetherimid [PEI], $267 \times 207 \times 140$ mm, Tecniplast, Hohenpeißenberg) auf Labortiereinstreu (PS 14 select, ssniff, Soest) gehalten. Trächtigen Zuchtweibchen wurde zusätzlich Nistmaterial (Nestlets, EBECO, Castrop-Rauxel) angeboten. Trinkwasser und Alleinfuttermittel für Labornager (ssniff M-Zucht, 10 mm, autoklavierbar, ssniff, Soest) standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Jungtiere wurden nach Geschlechtern getrennt im Alter von drei bis vier Wochen abgesetzt, und durch Ohrlochcodierung individuell markiert. Bei Bedarf wurden die Tiere zur Identifizierung vor dem Absetzalter bei der Geburt durch Tätowierung individuell gekennzeichnet. Die Überprüfung des SPF-Status der Tierhaltung erfolgte durch ein regelmäßiges Hygienemonitoring im Abstand von drei Monaten nach den FELASA-Richtlinien (<http://www.felasa.eu>) (NICKLAS et al., 2002).

1.2. Tierversuch

Haltung und Zucht der etablierten dominant mutanten Mauslinien HST001 und SMA002 wurden nach den Vorschriften des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Tierversuche wurden im Moorversuchsgut Oberschleißheim und in Kooperation mit der „German Mouse Clinic“ (GMC) des Helmholtz Zentrums München mit Genehmigung der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) durchgeführt.

1.3. Versuchstiere

Die mutanten Mauslinien HST001 und SMA002, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden, wurden auf dem genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes C3HeB/FeJ (C3H) im Rahmen des Münchener ENU-Projekts etabliert (HOWALDT, 2004; TRAN, 2004). Beide Mauslinien wurden mit Hilfe eines dominant vererbten Hauptsymptoms gezüchtet. Die Erhaltungszucht der mutanten Mauslinien erfolgte auf dem Inzuchtstamm C3H. Zur chromosomalen Kartierung der ursächlichen Mutation wurden phänotypisch mutante Mäuse

aus der Erhaltungszucht mit Mäusen der Inzuchtstämme C57BL/6Jco (C57BL/6) oder BALB/cJ (BALB/c) verpaart.

1.4. Erhaltungszucht

Die Zucht der Mäuse von Mauslinien aus phänotyp-basierten ENU-Projekten wird zunächst phänotypgesteuert mit Hilfe eines Hauptsymptoms durchgeführt. Nach Identifizierung der ursächlichen Mutation wird die Linie anhand von Genotypuntersuchungen weitergeführt. Für die Erhaltungszucht der Mauslinien HST001 und SMA002 wurden heterozygote phänotypische Mutanten mit C3H-Wildtyptieren der Stammzucht verpaart.

In der Linie HST001 erfolgte die Phänotypisierung der Nachkommen nach zwölf Lebenswochen durch die mindestens zweimalige Bestimmung des Plasmaharnstoffwertes im Abstand von zwei Wochen. Als phänotypische Mutanten wurden Mäuse bei zweimaligem Nachweis eines Plasmaharnstoffwertes von $> 12 \text{ mmol/l}$ ($\triangleq > 70 \text{ mg/dl}$) definiert. Als eindeutige Wildtypkontrolltiere wurden Mäuse mit einem Plasmaharnstoffwert von $< 10 \text{ mmol/l}$ ($\triangleq < 60 \text{ mg/dl}$) bei männlichen Tieren bzw. $< 8 \text{ mmol/l}$ ($\triangleq < 50 \text{ mg/dl}$) bei weiblichen Tieren definiert. Nach Identifizierung der ursächlichen Mutation erfolgte die Zucht der Linie HST001 nach dem Genotyp. Des Weiteren erfolgte die Überprüfung des Genotyps aller Tiere, die vor der Identifizierung der ursächlichen Mutation basierend auf dem Phänotyp klassifiziert wurden und von denen weitere Versuchsdaten erhoben worden waren.

In der Linie HST001 erfolgte nach Etablierung der Genotypuntersuchung die Zucht homozygot mutanter Tiere durch Anpaarung zweier heterozygot mutanter Tiere.

Nachkommen der Mauslinie SMA002 wurden zwischen 21 und 28 Lebenstagen aufgrund eines abnormalen Verhaltens (auffälliges Kratzverhalten, verstärktes Putzverhalten) in Kombination mit niedrigem Körpergewicht ($< 10 \text{ g}$) der Gruppe der phänotypischen Mutanten zugeordnet. Nachkommen ohne Auftreten eines dieser beiden Hauptsymptome wurden den Wildtypkontrolltieren zugeteilt. Zur Zucht der Linie SMA002 wurden möglichst männliche Mutanten zur Verpaarung verwendet. Bei Verwendung von weiblichen mutanten Tieren war die Aufzuchttrate erniedrigt. Bei der Linie SMA002 wurde die gesamte Zucht aufgrund ihres Phänotyps durchgeführt.

1.5. Zucht für die Kopplungsanalyse

Je näher zwei Loci auf einem Chromosom beieinander liegen, desto häufiger werden sie miteinander vererbt, was als genetische Kopplung bezeichnet wird. Zur Identifizierung der ursächlichen Mutation in ENU-induzierten Mausmutanten wird eine Kopplungsanalyse

durchgeführt. In dieser Arbeit wurden dafür phänotypisch mutante, heterozygote Tiere aus der Erhaltungszucht mit Mäusen eines zweiten Inzuchtstammes verpaart. Die F1-Hybridgeneration wurde auf die Mutation des mutanten Elterntiers phänotypisch untersucht. Phänotypisch mutante F1-Hybriden wurden nochmals mit Mäusen des zweiten Inzuchtstammes verpaart und die N2-Rückkreuzungstiere phänotypisch untersucht. Phänotypisch mutante N2-Rückkreuzungstiere wurden für die Kopplungsanalyse verwendet.

HST001

In früheren Arbeiten wurde die Kopplungsanalyse für die Linie HST001 mit dem Inzuchtstamm C57BL/6 durchgeführt. Aufgrund der im Vergleich zu C3H-Tieren hohen Plasmaharnstoffwerte von C57BL/6-Tieren ergaben sich Schwierigkeiten, die N2-Rückkreuzungstiere mit Hilfe des Plasmaharnstoffwertes in phänotypische Mutanten und phänotypische Wildtypiere zu klassifizieren (TRAN, 2004). Deshalb wurde in dieser Studie die Kopplungsanalyse für die Linie HST001 mit dem Inzuchtstamm BALB/c durchgeführt, der niedrige Plasmaharnstoffwerte zeigt. Die phänotypische Untersuchung der Nachkommen erfolgte wie bei der Erhaltungszucht.

SMA002

Die Zucht für die chromosomale Lokalisierung der ursächlichen Mutation wurde bereits im Rahmen einer Dissertationsarbeit unter Verwendung des Inzuchtstammes C57BL/6 durchgeführt (HOWALDT, 2004).

In dieser Studie wurde mit Hilfe der vorhandenen Gewebe/DNA-Proben versucht, die chromosomale Lage der ursächlichen Mutation durch die Verwendung zusätzlicher polymorpher DNA-Marker genauer zu kartieren.

1.6. Zucht homozygot mutanter F2-Hybridtiere der Linie SMA002

Zur Zucht homozygoter Mutanten der Linie SMA002 mit gemischtem genetischem Hintergrund wurden heterozygote phänotypische Mutanten der C3H-Erhaltungszucht mit C57BL/6-Inzuchtmäusen verpaart. Nach phänotypischer Klassifizierung der F1-Hybridtiere wurden phänotypisch mutante F1-Hybridtiere miteinander verpaart. Unter Verwendung von eng mit der ursächlichen Mutation gekoppelten polymorphen DNA-Markern wurden die F2-Hybridtiere für den fraglichen Genomlocus genotypisch in homozygote Mutanten (C3H / C3H), heterozygote Mutanten (C3H / C57BL/6) und Wildtypiere (C57BL/6 / C57BL/6) eingeteilt.

1.7. Zucht eines kongenen Stammes für die Linie SMA002

Die Erstellung eines kongenen Stammes erfolgte durch Anpaarung heterozygoter phänotypisch mutanter Mäuse der Linie SMA002 mit C57BL/6-Inzuchtmäusen über sechs Generationen. Die Nachkommen wurden wie bei der C3H-Erhaltungszucht beschrieben phänotypisch in mutante Tiere und Wildtypiere eingeteilt.

2. Methoden

2.1. Blut

Zur phänotypischen Einteilung der Nachkommen der Linie HST001 in Mutanten und Wildtypiere und für die klinisch-chemischen und hämatologischen Untersuchungen wurde Mäusen unterschiedlichen Alters unter Ether-Inhalationsnarkose bzw. Isofluran-Inhalationsnarkose (in der „GMC“) durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus mittels eines Na-heparinisierten oder unheparinisierten 4 µl-Einmal-Kapillarröhrchens Blut entnommen. Zur Plasmagewinnung adulter Tiere wurden maximal 400 µl bzw. 500 µl (in der „GMC“) Blut entnommen, das in einem mit Lithium-Heparin beschichteten Probengefäß aufgefangen und für 1–2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) gelagert wurde. Anschließend wurden die Blutproben bei 7000 rpm und 8°C (in der „GMC“) für 10 Minuten (min) zentrifugiert und das Plasma in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei Messung der Proben innerhalb von 48 Stunden erfolgte die Lagerung des Plasmas bei 4°C, ansonsten bis zur weiteren Analyse bei -80°C.

Die Messung der klinisch-chemischen Parameter im Plasma wurde im Labor der „German Mouse Clinic“ (GMC) am Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Von Tieren ohne Futterentzug wurden die Elektrolyte Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid, Phosphat (anorganisch) und Eisen, die Substrate Gesamtprotein, Albumin, Kreatinin (enzymatisch), Harnstoff, Harnsäure, Gesamt-Cholesterol, Triglyceride, Glukose, Ferritin, Transferrin und Laktat, und die Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) (EC 2.6.1.2), Aspartat-Aminotransferase (AST) (EC 2.6.1.1), alkalische Phosphatase (AP) (EC 3.1.3.1), Lipase (EC 3.1.1.3), α -Amylase (EC 3.2.1.1) und Laktatdehydrogenase (LDH) (EC 1.1.1.27) gemessen. Von Tieren mit Futterentzug wurden Plasmalipid- (Triglyceride, Cholesterol, High Density Lipoprotein [HDL]-Cholesterol und nicht veresterte Fettsäuren [NEFA]) und Glukosewerte gemessen. Die Plasmakonzentration von nicht-HDL-Cholesterol wurde aus der Differenz von Gesamt-Cholesterol und HDL-Cholesterol berechnet. Alle klinisch-chemischen Messungen wurden mittels eines AU400 Analysegeräts (Olympus, STADT) wie in Aigner et al. (2007) beschrieben durchgeführt. Dazu wurden Testkits der Firma Olympus verwendet, außer für

den folgenden Parameter: Freie Fettsäuren wurden mit Hilfe eines Testkits der Firma Wako Chemicals GmbH (NEFA-HR) gemessen. Plasmakreatininwerte wurden enzymatisch bestimmt.

Für die hämatologische Untersuchung wurden 50 µl Blut in einem EDTA-beschichteten Probengefäß aufgefangen und umgehend (in der „GMC“ innerhalb von 3 Stunden, bis dahin platziert auf einem Rotationsschüttler) zur Bestimmung der Blutbildparameter mit dem ABC Animal Blood Counter (Scil, Viernheim) verwendet. Die folgenden hämatologischen Parameter wurden gemessen: Erythrozytenzahl (RBC), mittleres Erythrozytenvolumen (MCV), mittlerer Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (MCH), mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC), Erythrozytenverteilungsbreite (red cell distribution width, RDW), Hämoglobin (HB), Hämatokrit (HKT), Leukozytenzahl (WBC), Thrombozyten (PLT) und mittlere Thrombozytengröße (MPV).

Folgende Hämatologieparameter wurden direkt gemessen: rote Blutzellen: HB, MCV, RBC; weiße Blutzellen: WBC; PLT. RBC, WBC und PLT sowie die Zellgröße wurden durch elektrische Impedanz gemessen. HB wurde durch Spektralphotometrie quantifiziert. MCV, MPV und RDW wurden vom gemessenen Zellvolumen und der HKT mit der Formel $MCV \times RBC$ berechnet. MCH und MCHC wurden mit der Formel HB / RBC bzw. HB / HKT berechnet.

2.2. DNA

Genomische DNA wurde aus Schwanzspitzen, Embryonen oder Milzgewebe isoliert.

Probennahme

Schwanzspitzen wurden in der Regel beim Absetzen der Mäuse im Alter von drei bis vier Wochen bzw. bei Tötung der Tiere genommen. Embryonen wurden am Tag 14,5 der Trächtigkeit gewonnen. Milzprobengewebe aus der Kopplungsanalyse der Linie SMA002 waren bereits vorhanden (HOWALDT, 2004). Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C bzw. -80°C.

DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung aus den Gewebeproben erfolgte mit Hilfe von Cutting buffer oder Homogenisationspuffer.

Aufschluss mit Cutting buffer

Die Proben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in jeweils 400 µl Mastermix (Cutting Buffer 375 µl, 20 % SDS 20 µl, Proteinase K [20 mg/ml] 5 µl) über Nacht im

Brutschrank bei 60°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die unverdauten Bestandteile bei 13200 rpm für zwei Minuten abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die DNA-Fällung mit 400 µl Isopropanol und mehrmaligem Waschen des DNA-Pellets mit je 1 ml 70 %igem Ethanol. Das Pellet wurde nach Lufttrocknung in 50–400 µl T-Puffer (pH 8,0) resuspendiert.

Aufschluss mit Homogenisationspuffer

Die Proben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in jeweils 400 µl Homogenisationspuffer mit 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) über Nacht bei 60°C im Brutschrank inkubiert.

Am folgenden Tag wurden je nach Erfolg des Verdaus erneut 5–10 µl Proteinase K zugegeben und weitere zwei Stunden bei 60°C im Schüttel-Thermoblock inkubiert. Danach wurden die unverdauten Bestandteile bei 13200 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 400 µl 4,5 M NaCl zugegeben und gemischt. Daraufhin wurden 600 µl PCiA zugegeben, gemischt und fünf Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß verbracht. Der PCiA-Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Anschließend erfolgte die DNA-Fällung mit 300 µl Isopropanol. Nach dem Waschen der DNA mit 70 %igem Ethanol und Lufttrocknung wurde die DNA in 50 µl T-Puffer resuspendiert.

Konzentrationsbestimmung der DNA

Zur Einstellung der genomischen DNA auf eine Konzentration von 100 ng/µl erfolgte die Ermittlung der DNA-Konzentration durch Messung der optischen Dichte (OD) in einem Spektralphotometer mit einer Verdünnung von 1:30 bei den Wellenlängen von 260 nm und 280 nm.

2.3. RNA und cDNA-Synthese

RNA wurde aus Nierengewebe von Mäusen der Linie HST001 und aus Gehirngewebe von Tieren der Linie SMA002 gewonnen.

Probennahme

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Nach schnellstmöglicher Organentnahme wurden diese mit einer Analysenwaage gewogen, sofort auf Trockeneis tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

RNA-Isolierung

Sämtliche Schritte zur RNA-Isolierung wurden mit Filter-Pipettenspitzen und auf Eis durchgeführt.

50–100 mg Organgewebe wurde in 1 ml TRIzol[®] Reagent überführt und mechanisch mit Hilfe eines Gewebe-Homogenisators 30–60 Sekunden bei 23500 rpm zerkleinert. Die Reinigung des Homogenisator-Stabes zwischen den Gewebeproben erfolgte mit Aqua bidest, 0,2 M NaOH und Aqua bidest. Die RNA-Isolierung aus den homogenisierten Proben erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Konzentrationsbestimmung der RNA

Die RNA-Konzentrationsmessung erfolgte durch Messung der optischen Dichte mit einem Spektralphotometer bei 260 nm und 280 nm.

Qualität der RNA

Die Qualität der RNA wurde über die Quantität der ribosomalen Banden 28S und 18S auf einem 1,5 %igem TAE-Gel überprüft (siehe 2.5). Die Gelapparatur wurde zuvor 1 Stunde lang mit 10 %igem SDS inkubiert. Nicht degradierte mRNA stellt sich durch eine 28S- und 18S-rRNA-Bandenstärke im Verhältnis von 2:1 dar.

cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA wurde zuerst eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA entfernt, bevor die reverse Transkription durchgeführt wurde.

Beide Schritte wurden mit Reagenzien (siehe XI.1) der Firmen Fermentas, Invitrogen, Promega und Roche nach dem Protokoll der Hersteller durchgeführt.

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4. PCR, RT-PCR und „Cycle-Sequencing“-Verfahren

Für die PCR wurde genomische DNA, verdünnt auf 100 ng/μl, für die RT-PCR cDNA und für das „Cycle-Sequencing“-Verfahren Eluat aus PCR- oder RT-PCR-Produkten verwendet. Die DNA-Menge, die für das „Cycle-Sequencing“-Verfahren benötigt wurde, wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA-Menge in ng} = \text{DNA-Fragmentlänge in bp} / 100 * 1,5$$

Alle Reaktionsansätze wurden mit Filter-Pipettenspitzen in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen mit unterschiedlichem Endvolumen auf Eis angesetzt.

PCR/RT-PCR-Standardprotokoll

Standard-Reaktionsansatz für 50 µl Gesamtvolumen

10x PCR Puffer	5 µl
dNTPs (je 2mM)	5 µl
MgCl ₂ (15mM)	5 µl
sense Primer (10pmol/µl)	0,6 µl
antisense Primer (10pmol/µl)	0,6 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
DNA/cDNA	2 µl
Aqua bidest.	ad 50 µl

Die Standard-Reaktionsansätze wurden mit Hilfe der Taq DNA Polymerase (Agrobiogen) durchgeführt, in Ausnahmefällen wurde der Taq DNA Polymerase Kit (Qiagen) verwendet.

Standard-Reaktionsbedingungen

Denaturierung	94°C	5 min] 35x
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	X°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Finale Extension	72°C	5 min	

Die Annealing-Temperatur wurde abhängig von den Primern und die Extensionsdauer abhängig von der PCR/RT-PCR-Produktlänge (ca. 1 min für 1 kb) gewählt.

Das Resultat der PCR/RT-PCR-Reaktion bzw. das Auftreten von Amplifikat-Kontaminationen im Reaktionsansatz wurde durch Positiv- und Negativkontrollen überprüft.

„Cycle-Sequencing“-Protokoll

Reaktionsansatz für 10 µl Gesamtvolumen

5x Sequenzier-Puffer	4 µl
BigDye-Lösung	1 µl
Primer (10pmol/µl)	1 µl
Eluat	2 od 4 µl
Aqua bidest.	ad 10 µl

Reaktionsbedingungen

Denaturierung	95°C	1 min] 40x
Denaturierung	95°C	5 sec	
Annealing	50°C	10 sec	
Extension	60°C	4 min	

Oligonukleotide

Die Oligonucleotide wurden über Thermo Fisher Scientific, Ulm, in HPLC-aufgereinigter Qualität bezogen.

Die Primersequenzen für die Mikrosatellitenanalyse wurden der MGI Datenbank des Jackson Laboratory entnommen (<http://www.informatics.jax.org>).

Geeignete SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) wurden für die verwendeten Inzuchtstämme mit Hilfe der NCBI/SNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/MouseSNP.cgi>) in Verbindung mit dem Programm NEBcutter V2.0 von New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) ausgewählt und danach die Primersequenzen zur Amplifikation des Locus ausgesucht.

Zum Teil wurden Primer mit Hilfe des Programmes von Integrated DNA Technologies (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>) oder mit Hilfe von NCBI/BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome) ausgewählt.

Oligonukleotide zur Feinkartierung in der Linie HST001

31_D7Mit238_F	(sense)	5' - GCA TCT GCT TTT CTG CCT CT - 3'
32_D7Mit238_R	(antisense)	5' - AGG CAC CTG ACA TTG ACC TC - 3'
37_D7Mit68_F	(sense)	5' - CTC CCA CAC AGG GTC TTT GT - 3'
38_D7Mit68_R	(antisense)	5' - GAT ACC CAA AGT ACA CCT CTG TCA - 3'
39_D7Mit40_F	(sense)	5' - GTC AAC AGT CAG GAA AGC TGG - 3'
40_D7Mit40_R	(antisense)	5' - CAG ATG CTT GTA TTT GCA AAG C - 3'

Oligonukleotide zur Kandidatengen-Sequenzierung und Genotypisierung in der Linie HST001

Umod_1_for	(sense)	5' - TAC TTG TGA ATG GAC CAG TCC TG - 3'
Umod_2_rev	(antisense)	5' - TAG CCC ACA CCA TAC TCT GTG C - 3'
Umod_3_for	(sense)	5' - TGT GAG CCA GGA CTG GAC TG - 3'
Umod_4_rev	(antisense)	5' - TGA GCA TTG TCT GTC ATT CAG G - 3'
Umod_5_for	(sense)	5' - TTG GAG TAC AGG CTG GAG TG - 3'
Umod_6_rev	(antisense)	5' - AGT GAA GGT AGA CAA GGT CG - 3'
Umod_7_for	(sense)	5' - AGC AAC TCC ACA GAC CCT GTG - 3'
Umod_8_rev	(antisense)	5' - ACA ACA GAC AGT GCT CAC AGC - 3'
Umod_13_for	(sense)	5' - TGG TCA CTG CCC TGA ACA TCA G - 3'
Umod_14_rev	(antisense)	5' - TGG AAG CAG CCT TGG ACA CTG - 3'
Umod_15_for	(sense)	5' - TGC TCC AAC AGC AGC TGT GTG - 3'
Umod_17_for	(sense)	5' - TGA GTG CAA TCT GGC TTA CTG C - 3'
Umod_18_rev	(antisense)	5' - TCA GGC TGA CTT TCA TGT CCA G - 3'
Umod_Ex3_for	(sense)	5' - TGC ACT GAT GTG GAT GAG TG - 3'
Umod_Ex3_rev	(antisense)	5' - AGT CCT GTT TAC ACT GGC AG - 3'
Umod_Int2_for	(sense)	5' - GAA TAG AGG ACT CCA CTC AG - 3'
Umod_Int2_rev	(antisense)	5' - GTC AGG GTC TCA TAT GTA TTG - 3'
EXT1_UMOD_for	(sense)	5' - GGA TGG TGT GGT CAC AAC G - 3'

EXT2_UMOD_rev	(antisense)	5' - GCC CAC ACC ATA CTC TGT G - 3'
INT1_UMOD_rev	(antisense)	5' - GTC AGA CGA AAA CCA TCC TTA C - 3'
INT2_UMOD_for	(sense)	5' - GGC TCG TTT AAG TGC TCA TT - 3'
INT2_UMOD_for_neu	(sense)	5' - GGC TCG TTT AAG TGC TCG TT - 3'

Oligonukleotide zur Feinkartierung in der Linie SMA002

3_D13Mit13_F	(sense)	5' - CTG TGG TAA GTC CAG ATT TG - 3'
4_D13Mit13_R	(antisense)	5' - GGA AAG AGT AGG AAG ATG CC - 3'
5_D13Mit253_F	(sense)	5' - TCA AGA GCC TTC CAC GAA AC - 3'
6_D13Mit253_R	(antisense)	5' - CTG AGA GGA AGA ATG GAA GAA TG - 3'
33_D13Mit64_F	(sense)	5' - CCT CAG CAC CAA AAA AGG AC - 3'
34_D13Mit64_R	(antisense)	5' - ACA TCA GTG ACC AGG CAT CA - 3'
35_D13Mit9_F	(sense)	5' - GGG TTC CAG ATT GAG TGG AA - 3'
36_D13Mit9_R	(antisense)	5' - TTG CCA AAG TGT CAA AAT CA - 3'
11_rs30824882/MscI_F	(sense)	5' - CAT TGG AGA GAT GGC TCT GTG - 3'
12_rs30824882/MscI_R	(antisense)	5' - ACC TCT CTG ATT CCT CAG CTG - 3'

Oligonukleotide zur Kandidatengen-Sequenzierung in der Linie SMA002

Agtbbp1_1_for	(sense)	5' - GGA GCC GTG AGT TGG GCG - 3'
Agtbbp1_1_for_neu	(sense)	5' - CAC CCG GAT TAT CTG CAA TG - 3'
Agtbbp1_2_rev	(antisense)	5' - GAT ACT GAG TTC ACA GAG TTG G - 3'
Agtbbp1_3_for	(sense)	5' - CTC CAC ATG AGG AGG TGA TGG - 3'
Agtbbp1_4_rev	(antisense)	5' - TGT AGA GCT GGG CCA CAG - 3'
Agtbbp1_5_for	(sense)	5' - AGT GTC ACG AAC ATC AAG TTG - 3'
Agtbbp1_6_rev	(antisense)	5' - AGA TCA TTG TTG AAG CTG TGG - 3'
Agtbbp1_7_for	(sense)	5' - GTG TTT GAG GGG AAG GCT CG - 3'
Agtbbp1_8_rev	(antisense)	5' - TCA GCC TCT CGA TGT CTT GG - 3'
Agtbbp1_9_for	(sense)	5' - CCA CTC ATC AAC AGA GCA GG - 3'
Agtbbp1_10_rev	(antisense)	5' - GTT CAC GGT GAA GGT GAT GG - 3'
Agtbbp1_11_for	(sense)	5' - GGC CTG GTG TGG CAT ATA GG - 3'
Agtbbp1_12_rev	(antisense)	5' - TTT GGA CTT TGC CAC TGT CTG - 3'
Agtbbp1_13_for	(sense)	5' - CTG CTC GGG TCC ATC CTG G - 3'
Agtbbp1_14_rev	(antisense)	5' - TCA AGC AGG TTG GAG GGC AG - 3'
Agtbbp1_15_for	(sense)	5' - CAG TTG TAG CTT TGT GGT GG - 3'
Agtbbp1_16_rev	(antisense)	5' - TGA TGC AGT GCC ACA GGA G - 3'
Agtbbp1_17_for	(sense)	5' - GGA GAA TTC TGA AGT GTG GAG - 3'
Agtbbp1_18_rev	(antisense)	5' - ACA CAT GAG AAA TTC TAG AGT G - 3'
NT1	(sense)	5' - TGG CTG AAG TGG CAT GGA C - 3'
NT1A	(sense)	5' - ATC CGT TCA CGT GCT CCT G - 3'
NT1B	(sense)	5' - CTC AGA TCA CCA CTG GTG C - 3'
NT2	(antisense)	5' - CTA CCC ATC CAG TGG GAT C - 3'
NT3	(sense)	5' - CTC CAC GGA TGT TGC TGA CC - 3'
NT3A	(sense)	5' - CGA GTG CTA CAA CCT CTG C - 3'
NT4	(antisense)	5' - CCT AGG ATA TCC AGG TAG ACG - 3'
NT5	(sense)	5' - CTC AGC CTC TGG TAC GCT C - 3'
NT6	(antisense)	5' - CGA TGC CTG GAG AAG GCT C - 3'
NT7	(sense)	5' - GAT AGA GTG CAT CAC CCA GG - 3'
NT8	(antisense)	5' - CTT GGG AAG GAC GGT CTG G - 3'
103_NT9_A_R	(antisense)	5' - GCC ATC AGC ACT GCG TCG - 3'
NT10R	(antisense)	5' - ACC AGG ATC TTA TCC TGC T - 3'
NT11F	(sense)	5' - TGA CCC GGA GAA CAT CAC - 3'
NT12R	(antisense)	5' - AGT ACA AAT CCT GAG TGT CG - 3'

2.5. Gelelektrophorese und Sequenzanalyse

2.5.1. Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Für kleine PCR-Fragmente (z.B. bei Mikrosatelliten-PCR) wurde hierfür ein 3–4 %iges Agarosegel verwendet, für größere PCR-Fragmente (> 300 bp) ein 0,7–2 %iges Agarosegel.

Eluation

Nach Auftrennung der Amplifikate mittels Gelelektrophorese wurde das zur Sequenzanalyse benötigte DNA-Fragment unter UV-Licht ausgeschnitten, mit einer Analysenwaage gewogen und mit dem QIAEX[®] II Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.5.2. Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten

EtOH-Fällung

Zu den 10 µl des „Cycle-Sequencing“-Produkts wurden 2,5 µl 125 mM EDTA und 30 µl 100 %iger EtOH (-20°C) hinzugegeben, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 4°C zentrifugiert (13000 rpm). Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 70 %igem EtOH bei -20°C gewaschen. Anschließend wurde 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgehoben, das Pellet luftgetrocknet, in 30 µl Aqua bidest. resuspendiert und auf eine PCR-Platte transferiert. Bis zur Analyse wurde die PCR-Platte bei -20°C aufbewahrt.

Sequenzanalyse am Helmholtz Zentrum München

Die Sequenzanalyse wurde am Helmholtz Zentrum München durchgeführt.

Bioinformatische Auswertung

Die Elektropherogramme wurden mittels des Programmes FinchTV V1.4.0 (Geospiza Inc., Seattle, USA) dargestellt. Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm BioEdit V7.0.0 (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, USA) durchgeführt.

3. Kopplungsanalyse

N2-Rückkreuzungstiere der Linie HST001 wurden nach Einteilung in phänotypische Mutanten oder Wildtypiere durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden Gewebeproben (Schwanzbiopsien) zur weiteren Untersuchung entnommen.

3.1. Grobkartierung der Linie HST001

Die Grobkartierung der ursächlichen Mutation wurde mit Hilfe eines genomweiten Sets von 121 polymorphen DNA-Markern (SNPs) (Tabelle 3) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Genetik (Prof. Dr. M. Hrabé de Angelis) des Helmholtz Zentrums München an 47 als phänotypische Mutanten klassifizierten Tieren (N2-Rückkreuzungstiere) untersucht.

Tabelle 3: Zur Grobkartierung verwendete SNPs und ihre Lokalisation

(nach KLAFTEN & HRABE DE ANGELIS, 2005)

Chromosom	Locus (Mb)	SNP	Chromosom	Locus (Mb)	SNP
1	23,5	rs13475764	2	14,3	rs13476355
1	38,1	rs13475818	2	37,0	rs13476434
1	65,6	rs32716288	2	50,7	rs13476490
1	65,8	rs32000655	2	70,8	rs13476567
1	76,2	rs3678148	2	95,6	rs3679193
1	81,7	rs30712373	2	114,2	rs27441842
1	116,7	rs13476065	2	129,5	rs27257388
1	126,9	rs30551255	2	164,2	rs3696248
1	144,1	rs30942489	2	169,3	rs13476909
1	160,0	rs31593281	2	181,6	rs3691120
1	172,7	rs33777727			
1	191,1	rs13476296			
1	195,1	rs13499691			
3	26,3	rs13477026	4	11,0	rs27731305
3	36,9	rs3151604	4	35,2	rs27781503
3	52,5	rs3685081	4	86,8	rs28056583
3	69,6	rs13477178	4	101,2	rs28307021
3	89,0	rs8259135	4	133,1	rs13477989
3	103,3	rs13477302	4	141,9	rs3711383
3	109,0	rs13477321			
3	129,6	rs16799508			
5	14,0	rs13481347	6	26,1	rs13478670
5	24,9	rs13478148	6	52,7	rs13478756
5	41,1	rs13478204	6	72,3	rs13478816
5	55,6	rs13478263	6	85,9	rs13478872
5	68,0	rs29635956	6	115,2	rs13478987
5	79,4	rs31585424	6	116,4	rs4226222
5	81,9	rs31610566	6	137,6	rs16815348
5	103,3	rs13478429	6	144,5	rs13479084
5	111,7	rs32067291			
5	127,2	rs13478514			
7	28,1	rs13479164	8	9,8	rs13479604
7	51,8	rs16793422	8	28,0	rs13479662
7	60,7	rs13479256	8	48,2	rs13479741
7	73,2	rs16805799	8	70,9	rs13479814
7	100,1	rs4226783	8	99,6	rs13479937
7	124,0	rs13479476	8	103,4	rs13479952
			8	116,7	rs13479998

Chromosom	Locus (Mb)	SNP	Chromosom	Locus (Mb)	SNP
9	57,7	rs13480217	10	8,2	rs13480484
9	65,0	rs13480245	10	22,6	rs13480541
9	96,2	rs3673055	10	68,9	rs13480638
			10	99,5	rs8258500
			10	117,8	rs13480784
11	7,1	rs13480851	12	13,2	rs13481307
11	21,6	rs13480905	12	25,8	rs13481351
11	32,3	rs26822879	12	75,0	rs8259450
11	54,0	rs26982471	12	83,4	rs6194112
11	62,8	rs13481061	12	99,3	rs13481604
11	83,2	rs13481127	12	114,1	rs13459138
11	98,6	rs27041242			
11	114,3	rs27000576			
13	19,5	rs6345767	14	22,9	rs30406796
13	42,9	rs13481783	14	59,6	rs30895903
13	69,4	rs13481863	14	74,1	rs30865397
13	83,2	rs13481910			
13	97,3	rs29566800			
13	111,2	rs30511458			
15	25,2	rs13482484	16	10,9	rs4161352
15	38,8	rs13482528	16	27,4	rs4165602
15	50,4	rs13482574	16	32,2	rs4170048
15	85,6	rs16820334	16	84,1	rs4211770
15	97,7	rs16804751			
17	11,6	rs33418817	18	25,5	rs29827614
17	28,2	rs33259283	18	38,2	rs29823686
17	40,9	rs33428427	18	57,8	rs13483379
17	72,7	rs13483097	18	70,6	rs13483427
17	85,5	rs13483140			
19	13,9	rs6247194			
19	26,0	rs13483576			
19	43,6	rs4232188			
19	56,3	rs6339594			

Mb: Megabasen; SNP: Einzelnukleotid-Polymorphismen

3.2. Feinkartierung der Linien HST001 und SMA002

Nach den Ergebnissen der Grobkartierung für die Linie HST001 bzw. der bereits durchgeführten Kartierung für die Linie SMA002 (HOWALDT, 2004) wurden zur Präzisierung der chromosomalen Lokalisation der ursächlichen Mutation entsprechende weitere polymorphe DNA-Marker zur Untersuchung an einem größeren Pool von N2-Rückkreuzungstieren ausgewählt.

HST001

Für die Feinkartierung auf Chromosom 7 wurden drei polymorphe Mikrosatellitenmarker (Tabelle 4) verwendet. Hierfür wurden 31 DNA-Proben der bereits bei der Grobkartierung verwendeten mutanten N2-Rückkreuzungstiere und DNA-Proben von weiteren 17 als

phänotypische Mutanten klassifizierten N2-Tieren sowie 34 Proben von als Wildtypiere eingeteilten N2-Tieren zur Analyse herangezogen.

Tabelle 4: Zur Feinkartierung auf Chromosom 7 ausgewählte Mikrosatelliten

Mikrosatellit	Locus (Mb)	Primerpaar	PCR Annealing	Fragmentlänge (bp)	
				C3H	BALB/c
D7Mit40	124,0	39_D7Mit40_F/40_D7Mit40_R	63°C	228	204
D7Mit238	126,2	31_D7Mit238_F/32_D7Mit238_R	61°C	132	116
D7Mit68	132,5	37_D7Mit68_F/38_D7Mit68_R	60°C	188	94

Mb: Megabasen; bp: Basenpaare;

Datenbank MGI, The Jackson Laboratory, Stand Januar 2009 (<http://www.informatics.jax.org>)

SMA002

Um die Mutation auf Chromosom 13 näher einzugrenzen, wurden vier polymorphe Mikrosatellitenmarker und ein SNP verwendet (Tabelle 5). Mit den Mikrosatellitenmarkern D13Mit13 und D13Mit253 wurden von den N2-Rückkreuzungstieren 229 heterozygote phänotypische Mutanten und 16 phänotypische Wildtypiere analysiert. Heterozygote phänotypische Mutanten mit homozygotem Genotyp für C57BL/6 in beiden Mikrosatelliten-Untersuchungen wurden weiterhin mit den Mikrosatellitenmarkern D13Mit64 und D13Mit9 untersucht (15 Mäuse). Mit dem SNP-Marker rs30824882 wurden heterozygote phänotypische Mutanten mit homozygotem Genotyp für C57BL/6 in mindestens einem der beiden ersten Mikrosatelliten-Untersuchungen (24 Tiere), ebenso wie alle phänotypischen Wildtypiere (16 Tiere), analysiert. Für den Restriktionsenzymverdau hinsichtlich des SNP-Markers wurden 10 µl des PCR-Produkts mit 10 µl Mastermix (2 µl 10x NEB4-Puffer, 0,3 µl MscI-Restriktionsenzym, 7,7 µl Aqua bidest) mindestens 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

Tabelle 5: Zur Feinkartierung auf Chromosom 13 ausgewählte polymorphe DNA-Marker

DNA-Marker	Locus (Mb)	Primerpaar	PCR Annealing	Fragmentlänge (bp)	
				C3H	C57BL/6
D13Mit64	45,2	33_D13Mit64_F/34_D13Mit64_R	60°C	116	102
D13Mit13	56,6	3_D13Mit13_F/4_D13Mit13_R	55°C	138	148
rs30824882	58,0	11_rs30824882/MscI_F/12_rs30824882/MscI_R	64°C	288	185/103
D13Mit253	64,1	5_D13Mit253_F/6_D13Mit253_R	52°C	100	78
D13Mit9	81,2	35_D13Mit9_F/36_D13Mit9_R	57°C	145	126

Mb: Megabasen; bp: Basenpaare;

Datenbank MGI, The Jackson Laboratory, Stand Januar 2010 (<http://www.informatics.jax.org>)

3.3. Untersuchung zum Auftreten von homozygoten Mutanten in der Linie SMA002

Vor der Identifizierung der ursächlichen Mutation ist oft unsicher, ob nach Anpaarung von heterozygoten phänotypischen Mutanten homozygot mutante Tiere auftreten. Zur Abklärung dieser Frage in der Linie SMA002 wurden F2-Hybridtiere mit dem genetischen Hintergrund der Inzuchtstämme C3H und C57BL/6 gezüchtet (siehe 1.6) und mit polymorphen DNA-Markern analysiert, die eine starke genetische Kopplung mit der ursächlichen Mutation aufwiesen. Dafür wurden Gewebeproben von Embryonen am Tag 14,5 (n = 108) und neugeborenen Tieren (n = 28) mit den Mikrosatelliten-Markern D13Mit13 und D13Mit253 untersucht (Tabelle 5).

4. Suche nach der ursächlichen Mutation

Die Recherche nach Kandidatengen wurde mit Hilfe der Programme PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), PosMed „Positional MEDLINE“ (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/>), Ensembl (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Index), MGI (<http://www.informatics.jax.org/>) und NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt.

4.1. HST001

4.1.1. Kandidatengen

Nach Auswertung von Kopplungsanalyse, Datenbankanalyse und Literaturrecherche wurde Uromodulin (*Umod*, Chromosom 7, 126,6 Mb; Transkript: NCBI Accession-No. NM_009470.4, 2472 nt, 642 aa, 11 Exons; Gen: NCBI Accession-No. NC_000073.5, 16392 nt) als Kandidatengen zur Sequenzanalyse ausgewählt.

4.1.2. Sequenzanalyse

Für die Sequenzierung wurde die cDNA aus Nierengewebe von drei heterozygoten phänotypischen Mutanten und drei phänotypischen Wildtyptieren der Linie HST001 verwendet. Zur Bestätigung wurde die genomische DNA im Bereich von Intron 2/Exon 3 (beinhaltet die ursächliche Mutation) und im Bereich von Exon 3/Intron 3 der drei heterozygoten phänotypischen mutanten Tiere und der drei phänotypischen Wildtyptiere sequenziert, sowie die cDNA von zwei C3H-Tieren aus der Stammzucht und die genomische DNA von drei genotypisch homozygoten Mutanten (Tabelle 6).

Tabelle 6: Primerpaare zur Sequenzanalyse von *Umod*

NCBI Accession-No.	Primerpaar	PCR Annealing	Länge (bp)
NM_009470.4	Umod_1_for/Umod_2_rev	64°C	704
NM_009470.4	Umod_15_for/Umod_4_rev	63°C	876
NM_009470.4	Umod_3_for/Umod_4_rev	64°C	645
NM_009470.4	Umod_17_for/Umod_18_rev	63°C	523
NM_009470.4	Umod_17_for/Umod_14_rev	63°C	1076
NM_009470.4	Umod_5_for/Umod_6_rev	61°C	712
NM_009470.4	Umod_13_for/Umod_8_rev	63°C	911
NM_009470.4	Umod_7_for/Umod_8_rev	64°C	702
NC_000073.5	Umod_Int2_for/Umod_Int2_rev	60°C	600
NC_000073.5	EXT1_UMOD_for/EXT2_UMOD_rev	60°C	451
NC_000073.5	Umod_Ex3_for/Umod_Ex3_rev	60°C	736

bp: Basenpaare

Die PCR/RT-PCR-Reaktionen wurden in entsprechenden Reaktionsansätzen mit Hilfe des Taq DNA Polymerase Kits (Qiagen) oder der Taq DNA Polymerase (AgrobioGen) durchgeführt.

4.1.3. Allelspezifische PCR zur Genotypisierung

Nach Identifizierung der ursächlichen Mutation im Uromodulin-Gen wurde zur Genotypisierung der Tiere eine allelspezifische PCR etabliert. Der allelspezifische Reverse-Primer INT1_UMOD_rev und der Forward-Primer EXT1_UMOD_for wurden ausgewählt, um das Wildtypallel zu amplifizieren (171 bp). Um das mutante Allel nachzuweisen, wurden der allelspezifische Forward-Primer INT2_UMOD_for_neu und der Reverse-Primer EXT2_UMOD_rev ausgewählt (321 bp).

Die PCRs wurden nach dem PCR-Standardprotokoll mit Halbierung des Volumens und folgenden Abweichungen: MgCl₂ 2 µl, Taq 0,3 µl, bei Wt-Allel 2 µl Template, bei Mut-Allel 0,2 µl Primer, 33 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 57,8°C durchgeführt.

4.2. SMA002

4.2.1. Kandidatengene

Folgende Gene wurden nach Auswertung der Kopplungsanalyse, Datenbankanalyse und Literaturrecherche als Kandidatengene zur Sequenzanalyse herangezogen: *Ntrk2* (neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 = *TrkB*, tyrosine kinase receptor B, Chromosom 13, 58,9–59,2 Mb; Transkript 1: NCBI Accession-No. NM_001025074.1,

4614 nt, 821 aa, 18 Exons; Transkript 2: NCBI Accession-No. NM_008745.2, 7022 nt, 476 aa, 13 Exons; Gen: NCBI Accession-No. NC_000079.5, 323381 nt) und *Agtpbp1* (ATP/GTP binding protein 1, Chromosom 13, 59,6–59,7 Mb; Transkript 1: NCBI Accession-No. NM_023328.2, 4389 nt, 1218 aa, 26 Exons; Transkript 2: NCBI Accession-No. NM_001048008.1, 2932 nt, 789 aa, 18 Exons; Gen: NCBI Accession-No. NC_000079.5, 107785 nt).

4.2.2. Sequenzanalyse

4.2.2.1. *Ntrk2*

Um in dem Gen *Ntrk2* nach Mutationen zu suchen, wurde zunächst die cDNA aus Mäusegehirnen von zwei heterozygoten phänotypischen Mutanten und zwei phänotypischen Wildtyptieren sequenziert. Da das Gen lt. Datenbank der NCBI zwei Transkripte besitzt, wurde zunächst das Transkript 1 sequenziert und von Transkript 2 die davon abweichenden kodierenden Bereiche (Tabelle 7).

Tabelle 7: Primerpaare zur Sequenzanalyse von *Ntrk2*

NCBI Accession-No.	Primerpaar	PCR Annealing	Länge (bp)
NM_001025074.1	NT5/NT6	62°C	302
NM_001025074.1	NT5/NT12R	60°C	671
NM_001025074.1	NT11F/NT12R	57°C	338
NM_001025074.1	NT1A/NT10R	58°C	1261
NM_001025074.1	NT1A/103_NT9_A_R	60°C	1474
NM_001025074.1	NT3/NT4	64°C	1212
NM_001025074.1	NT3A/NT4	62°C	801
NM_001025074.1	NT7/NT8	62°C	217
NM_008745.2	NT1/NT2	64°C	1422
NM_008745.2	NT1B/NT2	60°C	544

bp: Basenpaare

4.2.2.2. *Agtpbp1*

Sequenziert wurde aus Gehirngewebe die cDNA des Transkriptes 1 von drei heterozygoten phänotypischen Mutanten, einem C3H-Tier aus der Stammzucht und mit den Primerpaaren *Agtpbp1_1_for/Agtpbp1_2_rev*, *Agtpbp1_1_for_neu/Agtpbp1_2_rev* und *Agtpbp1_15_for/Agtpbp1_16_rev* noch von einer weiteren C3H-Stammzuchtmaus. Da ein Transkript 2 existiert und sich dieses im Exon 18 von Transkript 1 unterscheidet, wurde die genomische DNA der gleichen Mäuse in diesem Bereich mit dem Primerpaar *Agtpbp1_17_for/Agtpbp1_18_rev* sequenziert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Primerpaare zur Sequenzanalyse von *Agtbbp1*

NCBI Accession-No.	Primerpaar	PCR Annealing	Länge (bp)
NM_023328.2	Agtbbp1_1_for/Agtbbp1_2_rev	63°C	714
NM_023328.2	Agtbbp1_1_for_neu/Agtbbp1_2_rev	57°C	624
NM_023328.2	Agtbbp1_3_for/Agtbbp1_4_rev	61°C	696
NM_023328.2	Agtbbp1_5_for/Agtbbp1_6_rev	60°C	731
NM_023328.2	Agtbbp1_7_for/Agtbbp1_8_rev	61°C	685
NM_023328.2	Agtbbp1_9_for/Agtbbp1_10_rev	60°C	685
NM_023328.2	Agtbbp1_11_for/Agtbbp1_12_rev	61°C	688
NM_023328.2	Agtbbp1_13_for/Agtbbp1_14_rev	61°C	715
NM_023328.2	Agtbbp1_15_for/Agtbbp1_16_rev	63°C	775
NC_000079.5	Agtbbp1_17_for/Agtbbp1_18_rev	56,2°C	486

bp: Basenpaare

5. Phänotypuntersuchung der Mauslinie HST001

Die Blutentnahme für die klinisch-chemische Untersuchung von 2, 4, 7, 12–13 und 84–99 Wochen alten Mäusen und für die Hämatologieuntersuchung mit Messung der Hämatologieparameter von 12–13 Wochen alten Tieren, die Osmolalitätsmessung des Harns von 39–42 Wochen alten Mäusen, die Morphologieuntersuchung von 2 und 84–99 Wochen alten Tieren und die Körpergewichtsentwicklung ab der Geburt wurden am Moorversuchsgut Oberschleißheim durchgeführt. Ebenso wurden am Moorversuchsgut Oberschleißheim für die systematische phänotypische Untersuchung innerhalb der „GMC“ des Helmholtz Zentrums München auf dem genetischen Hintergrund des C3H-Inzuchtstammes für beide Geschlechter jeweils 20 heterozygote Mutanten und 20 Wildtypkontrolltiere gezüchtet. Die Tiere wurden in zwei Gruppen von je 10 Mäusen pro Geschlecht und Phänotyp aufgeteilt, die jeweils eine der zwei Untersuchungsabläufe der „GMC“ durchliefen.

Die Untersuchung von klinischer Chemie, Hämatologie und Stoffwechsel bei Tieren im Alter von 35–36 bzw. 39–42 Wochen, die Untersuchung der klinischen Chemie von Mäusen im Alter von 36–37 Wochen und die Messung der klinisch-chemischen Blutparameter der im Moorversuchsgut durchgeführten Blutentnahmen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem klinisch-chemischen Screen (Dr. B. Rathkolb) des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie innerhalb der „GMC“ (Prof. Dr. M. Hrabé de Angelis) des Helmholtz Zentrums München.

Die Morphologieuntersuchung von 50–51 Wochen alten Tieren und der Westernblot aus den Urinproben von 39–42 Wochen alten Mäusen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Kemter (Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie) durchgeführt.

Innerhalb der „GMC“ (Prof. Dr. M. Hrabé de Angelis) des Helmholtz Zentrums München fanden in Zusammenarbeit mit weiteren Arbeitsgruppen Untersuchungen statt zur Dysmorphologie (Institut für Experimentelle Genetik, Dr. H. Fuchs, Dr. W. Hans) und zur Blutdruck- und Herzfrequenzmessung, Nt-proANP-Messung und Echokardiographie (Institut für Experimentelle Genetik, Dr. A. Schrewe und Innere Medizin III der Kardiologie Heidelberg, Dr. B. Ivandic, Prof. Dr. H. Katus).

5.1. Klinisch-chemische Blutuntersuchung

Es wurden Blutproben von 2 Wochen (n = 51; m: 29; w: 22), 4 Wochen (n = 81; m: 43; w: 38), 7 Wochen (n = 61; m: 33; w: 28), 12–13 Wochen (n = 46; m: 26; w: 20), 35–36 Wochen (n = 39; m: 19; w: 20) und 84–99 Wochen (n = 30; m: 18; w: 12) alten Tieren gewonnen (siehe 2.1).

Zusätzlich wurden Blutproben von 36–37 Wochen alten Tieren (n = 40; m: 20; w: 20) entnommen, denen über Nacht für 16-18 Stunden das Futter entzogen worden war. Diese Proben wurden zur Messung der Plasmalipid- (Triglyceride, Cholesterol, HDL-Cholesterol, nicht-HDL-Cholesterol und NEFA) und Glukosewerte verwendet (siehe 2.1).

5.2. Hämatologie

Es wurden Blutproben von 12–13 Wochen (n = 46; m: 26; w: 20) und 35–36 Wochen (n = 39; m: 19; w: 20) alten Tieren gewonnen (siehe 2.1).

5.3. Urin- und Nierenfunktionsuntersuchung

Zur Messung der klinisch-chemischen Parameter (Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid, Magnesium, Phosphat (anorganisch), Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Glukose, Gesamtprotein und Albumin) im Urin wurde 24-Stunden-Sammelurin verwendet, der in Stoffwechselkäfigen gesammelt wurde. Die Kreatinin-Konzentrationen im Urin wurden mit Hilfe der Jaffé-Methode bestimmt.

Die Hauptparameter der Untersuchung der Nierenfunktion waren Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, Natrium, Kalium, Chlorid und Kalzium im Blut und Harn, Harnosmolalität und 24-Stunden-Harnvolumen.

Das Körpergewicht, die Wasser- und Futteraufnahme, die Fäces-Produktion und die Urinausscheidung wurden in Stoffwechsellkäfigen (Tecniplast, Buguggiate, Italien) bei 39–42 Wochen alten Mäusen (n = 34; m: 16; w: 18) untersucht. Die Harnosmolalität wurde durch Abfall des Gefrierpunkts mit einem digitalen Mikro-Osmometer am Moorversuchgut Oberschleißheim bestimmt. Die tägliche Harnausscheidung von Elektrolyten und weiteren Harnbestandteilen wurde gemessen. Die Kreatinin-Clearance wurde kalkuliert mit der Formel: $\text{Kreatinin-Clearance} = (\text{Kreatinin [mit Jaffe-Methode bestimmt; Krea]})_{24\text{h-Harn}} \times 24\text{h-Harnvolumen} / (\text{Kreatinin [enzymatisch bestimmt; Ekrea]})_{\text{Plasma}}$. Die fraktionelle Exkretion eines Stoffes x (FEx) wurde durch die Formel $\text{FEx} = ([\text{X}]_{24\text{h-Harn}} \times 24\text{h-Harnvolumen}) / ([\text{X}]_{\text{Plasma}} \times \text{Kreatinin-Clearance}) \times 100$ bestimmt. Blutproben für Messungen der Plasmaparameter wurden von den entsprechenden Mäusen eine Woche (fünf Tage) vor der Untersuchung in den Stoffwechsellkäfigen genommen.

5.4. Westernblot von Urinproben

24-Stunden-Urin (standardisiert auf gleiche Kreatinin-Werte) von 39–42 Wochen alten heterozygoten Mutanten und Wildtyptieren wurde durch Kochen nach Zugabe von Beta-Mercaptoethanol denaturiert und auf ein 8 %iges SDS-Polyacrylamidminigel aufgetragen. Westernblot und Immundetektion wurden ausgeführt wie beschrieben (KLOSE et al., 2005). Für die Detektion von Uromodulin im Urin wurde folgender Primär-Antikörper verwendet: goat anti-human Uromucoid (1.500; MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich).

5.5. Morphologische Untersuchung

Untersucht wurden Mäuse unterschiedlichen Alters (Tabelle 9).

Tabelle 9: Morphologische Untersuchung der Linie HST001

Alter (Wo)	aus Anpaarungen	Tierzahl (m/w)	Parameter
2	Het × Het	54 (30/24)	KGW, Nieren, NRL
50–51	Het × Wt	37 (18/19)	KGW, Karkasse, Nieren, Leber, Milz, Herz, Lunge, Magen, Harnblase
84–99	Het × Wt	30 (18/12)	KGW, Karkasse, Nieren, Leber, Milz, Herz, Lunge, Magen, Harnblase

Wo: Wochen; m: männlich; w: weiblich; Wt: Wildtyptiere; Het: heterozygote Mutanten;

KGW: Körpergewicht; NRL: Nasenrumpflänge

Die Mäuse wurden unter Ether-Inhalationsnarkose durch zervikale Dislokation getötet. Das Körpergewicht wurde in Narkose mit einer Präzisionswaage bestimmt, und die

Nasenrumpflänge (NRL) wurde in Bauchlage gemessen. Die Präparation der Organe erfolgte in fixierter Rückenlage. Die fettfrei herauspräparierten Organe wurden mittels Zellstoff getrocknet und mit einer Analysenwaage auf 0,1 mg genau gewogen, hierbei die Nieren ohne Nierenkapsel und der Magen und die Harnblase in geleertem Zustand. Nach der Organentnahme wurden Kopf und Schwanz vom Körper abgetrennt, die Haut stumpf abpräpariert, restliches Fett entfernt und das Karkassengewicht mit einer Präzisionswaage bestimmt.

5.6. Vergleich der Körpergewichtsentwicklung von Tieren aus Anpaarungen von heterozygoten Mutanten

Die Mäuse aus den Anpaarungen von heterozygoten Mutanten (n = 181; m: 94; w: 87) wurden spätestens einen Tag nach ihrer Geburt in wöchentlichem Abstand ± 1 Tag gewogen.

5.7. Weitere phänotypische Untersuchungen

Vorgehen der Untersuchungen von Dymorphologie, Blutdruckmessung, Echokardiographie und Nt-proANP-Messung siehe IV.1.3.3.2 und IV.1.3.3.3.

6. Statistik

Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem Software-Programm Microsoft Excel 2003 durchgeführt. Die Werte wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Student's *t*-Test ausgewertet. Die Diagramme wurden mit dem Software-Programm GraphPad Prism 4 dargestellt. Der χ^2 -Test wurde mit der Formel $\chi^2 = \sum(\text{Beobachtungswert} - \text{Erwartungswert})^2 / \text{Erwartungswert}$ durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

1. Mauslinie HST001

1.1. Ausgangspunkt der Arbeit

Innerhalb der klinisch-chemischen Untersuchung des Münchener ENU-Mausmutageneseprojekts zeigte das männliche F1-Tier, Nr. 20003171 einen erhöhten Plasmaharnstoffwert, der ein Anzeichen einer Nierenfunktionsstörung ist. Die Züchtung dieses Tiers auf dem genetischen Hintergrund des C3H-Inzuchtstammes bestätigte die Vererbbarkeit dieses Phänotyps für mehr als zehn Generationen. Somit war die dominant mutante Linie HST001 (= UREHD1) etabliert (AIGNER et al., 2007).

In einer früheren Doktorarbeit wurde eine basale phänotypische Beschreibung dieser Linie durchgeführt (TRAN, 2004). Da die ursächliche Mutation zum damaligen Zeitpunkt unbekannt war, erfolgte die Untersuchung von heterozygot mutanten Tieren im Vergleich zu Wildtypwurfgeschwistern, wobei die Tiere anhand des Plasmaharnstoffwertes phänotypisch den beiden Gruppen zugeordnet wurden. Es zeigte sich eine vollständige phänotypische Penetranz der Mutation. Die Analyse beinhaltete die klinisch-chemische und hämatologische Untersuchung (12, 18 und 24 Wochen p.p.), die Bestimmung von Harnstoff und Albumin im Harn (24 Wochen p.p.) und eine morphologische Untersuchung (35 Wochen p.p.). Zur Kartierung der Mutation wurde C57BL/6 als zweiter Inzuchtstamm verwendet. Durch die relativ hohen Plasmaharnstoffwerte dieses Inzuchtstammes war die eindeutige phänotypische Zuordnung der Nachkommen in mutante Tiere und Wildtypwurfgeschwister erschwert. Die ursächliche Mutation wurde auf Chromosom 7 kartiert, allerdings wurde aufgrund des Auftretens von widersprüchlichen Einzelergebnissen auf die weitere Eingrenzung der chromosomalen Lage mit diesem Probenmaterial verzichtet (TRAN, 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die weiterführende genotypische und phänotypische Untersuchung der Linie HST001. Im Einzelnen sollten besonders folgende Analysen durchgeführt werden:

- Kartierung der Mutation unter Verwendung von BALB/c als zweiten Inzuchtstamm;
- Identifizierung der ursächlichen Mutation;
- Untersuchung von homozygot mutanten und heterozygot mutanten Tieren im Vergleich zu Wildtypwurfgeschwistern nach genotypischer Zuordnung der Tiere zu den Versuchsgruppen;

- Eingehende phänotypische Untersuchung mit besonderem Augenmerk auf den Beginn des Auftretens des abnormen Phänotyps bei jungen Tieren und auf die Langzeitauswirkungen der Mutation bei alten Tieren.

1.2. Identifikation der ursächlichen Mutation

1.2.1. Grobkartierung

Zur Kopplungsanalyse wurde der Inzuchtstamm BALB/c verwendet. Es wurden 455 N2-Tiere untersucht, die nach mindestens zweimaliger Bestimmung des Plasmaharnstoffwertes als heterozygote phänotypische Mutanten ($n = 198$; männlich ≥ 12 mmol/l ± 70 mg/dl; weiblich ≥ 11 mmol/l ± 65 mg/dl), phänotypische Wildtypiere ($n = 73$; männlich < 10 mmol/l ± 60 mg/dl; weiblich < 9 mmol/l ± 55 mmol/l) und Tiere mit nicht eindeutigem Phänotyp ($n = 184$) eingeteilt wurden (Tabelle 10). In Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Genetik (Prof. Dr. M. Hrabé de Angelis) des Helmholtz Zentrums München wurden von den 198 heterozygoten phänotypischen Mutanten 47 Mäuse (mit Plasmaharnstoffwerten > 13 mmol/l ± 80 mg/dl in zwei Untersuchungen) mit Hilfe eines genomweiten Sets von 121 polymorphen DNA-Markern (Tabelle 11) untersucht. Neun der 121 polymorphen DNA-Marker wurden von der Analyse ausgeschlossen, da sie keine sinnvollen Werte ergaben. Die Analyse der verbliebenen 112 Marker erbrachte die stärkste Kopplung ($\chi^2 = 28,44$; $p < 0,0001$) der ursächlichen Mutation zum Marker rs13479476 bei 124,0 Mb auf Chromosom 7 (Tabelle 11, Abbildung 4).

Tabelle 10: Phänotypdaten der N2-Rückkreuzungstiere für die Kopplungsanalyse der Linie HST001

	Blutentnahme n (m/w)	Phänotyp nach Plasmaharnstoffwert (mmol/l)		
		Wt (m:<10/w:<9)	Het (m: \geq 12/w: \geq 11)	nicht eindeutig (m:10-<12/w:9-<11)
1. Blutentnahme	455 (219/236)	111 (54/57)	219 (105/114)	125 (60/65)
2. Blutentnahme	451 (216/235)	117 (56/61)	216 (109/107)	118 (51/67)
3. Blutentnahme	141 (60/81)	33 (15/18)	63 (31/32)	45 (14/31)
Einordnung gesamt	455 (219/236)	73 (37/36)	198 (103/95)	184 (79/105)

Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; n: Anzahl; m: männlich; w: weiblich

Tabelle 11: Kopplungsanalyse der Linie HST001

(SNP-Marker nach KLAFTEN & HRABE DE ANGELIS, 2005)

Chromosom	Locus (Mb)	SNP	Genotyp C3H BALB/c (n)	Genotyp BALB/c BALB/c (n)	Fehler (n)	Gesamt (n)	χ^2	p-Wert
1	23,5	rs13475764	21	17	9	47	0,4	>0,01
1	38,1	rs13475818	23	18	6	47	0,6	>0,01
1	65,6	rs32716288	18	20	9	47	0,1	>0,01
1	76,2	rs3678148	16	22	9	47	1,0	>0,01
1	81,7	rs30712373	23	23	1	47	0,0	>0,01
1	116,7	rs13476065	21	24	2	47	0,2	>0,01
1	126,9	rs30551255	21	18	8	47	0,2	>0,01
1	144,1	rs30942489	25	21	1	47	0,4	>0,01
1	160,0	rs31593281	21	17	9	47	0,4	>0,01
1	172,7	rs33777727	21	14	12	47	1,4	>0,01
1	195,1	rs13499691	21	17	9	47	0,4	>0,01
2	14,3	rs13476355	19	26	2	47	1,1	>0,01
2	37,0	rs13476434	19	21	7	47	0,1	>0,01
2	50,7	rs13476490	18	18	11	47	0,0	>0,01
2	70,8	rs13476567	28	18	1	47	2,2	>0,01
2	95,6	rs3679193	23	14	10	47	2,2	>0,01
2	114,2	rs27441842	25	19	3	47	0,8	>0,01
2	129,5	rs27257388	30	14	3	47	5,8	>0,01
2	164,2	rs3696248	31	15	1	47	5,6	>0,01
2	169,3	rs13476909	21	14	12	47	1,4	>0,01
2	181,6	rs3691120	27	16	4	47	2,8	>0,01
3	26,3	rs13477026	17	28	2	47	2,7	>0,01
3	36,9	rs3151604	22	18	7	47	0,4	>0,01
3	52,5	rs3685081	19	22	6	47	0,2	>0,01
3	69,6	rs13477178	22	23	2	47	0,0	>0,01
3	89,0	rs8259135	15	21	11	47	1,0	>0,01
3	103,3	rs13477302	16	19	12	47	0,3	>0,01
3	109,0	rs13477321	21	23	3	47	0,1	>0,01
3	129,6	rs16799508	14	22	11	47	1,8	>0,01
4	11,0	rs27731305	19	19	9	47	0,0	>0,01
4	35,2	rs27781503	18	26	3	47	1,5	>0,01
4	86,8	rs28056583	18	18	11	47	0,0	>0,01
4	101,2	rs28307021	21	16	10	47	0,7	>0,01
4	133,1	rs13477989	20	25	2	47	0,6	>0,01
4	141,9	rs3711383	19	19	9	47	0,0	>0,01
5	14,0	rs13481347	26	20	1	47	0,8	>0,01
5	24,9	rs13478148	16	20	11	47	0,4	>0,01
5	55,6	rs13478263	17	27	3	47	2,3	>0,01
5	68,0	rs29635956	19	27	1	47	1,4	>0,01
5	79,4	rs31585424	11	26	10	47	6,1	>0,01
5	81,9	rs31610566	13	28	6	47	5,5	>0,01
5	103,3	rs13478429	12	31	4	47	8,4	>0,001
5	111,7	rs32067291	16	27	4	47	2,8	>0,01
5	127,2	rs13478514	15	27	5	47	3,4	>0,01

Tabelle 11 Fortsetzung 1

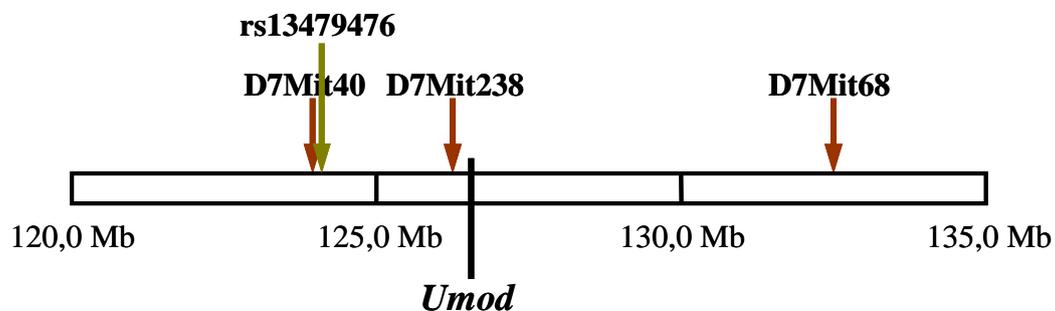
Chromosom	Locus (Mb)	SNP	Genotyp C3H BALB/c (n)	Genotyp BALB/c BALB/c (n)	Fehler (n)	Gesamt (n)	χ^2	p-Wert
6	26,1	rs13478670	17	21	9	47	0,4	>0,01
6	52,7	rs13478756	21	25	1	47	0,4	>0,01
6	72,3	rs13478816	20	24	3	47	0,4	>0,01
6	85,9	rs13478872	16	24	7	47	1,6	>0,01
6	115,2	rs13478987	17	21	9	47	0,4	>0,01
6	137,6	rs16815348	23	23	1	47	0,0	>0,01
6	144,5	rs13479084	22	16	9	47	1,0	>0,01
7	28,1	rs13479164	23	22	2	47	0,0	>0,01
7	51,8	rs16793422	22	13	12	47	2,3	>0,01
7	60,7	rs13479256	24	13	10	47	3,3	>0,01
7	73,2	rs16805799	25	12	10	47	4,6	>0,01
7	100,1	rs4226783	36	8	3	47	17,8	<0,0001
7	124,0	rs13479476	34	2	11	47	28,4	<0,0001
8	9,8	rs13479604	25	17	5	47	1,5	>0,01
8	28,0	rs13479662	22	19	6	47	0,2	>0,01
8	48,2	rs13479741	20	16	11	47	0,4	>0,01
8	70,9	rs13479814	28	16	3	47	3,3	>0,01
8	103,4	rs13479952	23	13	11	47	2,8	>0,01
8	116,7	rs13479998	25	11	11	47	5,4	>0,01
9	57,7	rs13480217	22	18	7	47	0,4	>0,01
9	65,0	rs13480245	20	17	10	47	0,2	>0,01
10	8,2	rs13480484	17	19	11	47	0,1	>0,01
10	22,6	rs13480541	24	21	2	47	0,2	>0,01
10	68,9	rs13480638	26	20	1	47	0,8	>0,01
10	99,5	rs8258500	25	20	2	47	0,6	>0,01
10	117,8	rs13480784	21	20	6	47	0,0	>0,01
11	7,1	rs13480851	23	17	7	47	0,9	>0,01
11	21,6	rs13480905	25	18	4	47	1,1	>0,01
11	32,3	rs26822879	28	18	1	47	2,2	>0,01
11	54,0	rs26982471	23	15	9	47	1,7	>0,01
11	62,8	rs13481061	23	14	10	47	2,2	>0,01
11	83,2	rs13481127	24	18	5	47	0,9	>0,01
11	98,6	rs27041242	25	19	3	47	0,8	>0,01
11	114,3	rs27000576	25	16	6	47	2,0	>0,01
12	13,2	rs13481307	20	26	1	47	0,8	>0,01
12	75,0	rs8259450	16	24	7	47	1,6	>0,01
12	83,4	rs6194112	20	18	9	47	0,1	>0,01
12	99,3	rs13481604	18	19	10	47	0,0	>0,01
12	114,1	rs13459138	28	18	1	47	2,2	>0,01
13	19,5	rs6345767	24	21	2	47	0,2	>0,01
13	42,9	rs13481783	20	18	9	47	0,1	>0,01
13	69,4	rs13481863	24	22	1	47	0,1	>0,01
13	83,2	rs13481910	19	19	9	47	0,0	>0,01

Tabelle 11 Fortsetzung 2

Chromosom	Locus (Mb)	SNP	Genotyp C3H BALB/c (n)	Genotyp BALB/c BALB/c (n)	Fehler (n)	Gesamt (n)	χ^2	p-Wert
13	97,3	rs29566800	18	20	9	47	0,1	>0,01
13	111,2	rs30511458	26	20	1	47	0,8	>0,01
14	22,9	rs30406796	25	11	11	47	5,4	>0,01
14	59,6	rs30895903	24	12	11	47	4,0	>0,01
14	74,1	rs30865397	23	15	9	47	1,7	>0,01
15	25,2	rs13482484	20	25	2	47	0,6	>0,01
15	38,8	rs13482528	23	23	1	47	0,0	>0,01
15	50,4	rs13482574	19	19	9	47	0,0	>0,01
15	85,6	rs16820334	26	18	3	47	1,5	>0,01
16	10,9	rs4161352	21	25	1	47	0,4	>0,01
16	27,4	rs4165602	18	18	11	47	0,0	>0,01
16	32,2	rs4170048	21	15	11	47	1,0	>0,01
16	84,1	rs4211770	22	14	11	47	1,8	>0,01
17	11,6	rs33418817	17	20	10	47	0,2	>0,01
17	28,2	rs33259283	16	21	10	47	0,7	>0,01
17	40,9	rs33428427	19	26	2	47	1,1	>0,01
17	72,7	rs13483097	16	29	2	47	3,8	>0,01
18	25,5	rs29827614	23	21	3	47	0,1	>0,01
18	38,2	rs29823686	21	17	9	47	0,4	>0,01
18	57,8	rs13483379	18	18	11	47	0,0	>0,01
18	70,6	rs13483427	23	23	1	47	0,0	>0,01
19	13,9	rs6247194	27	19	1	47	1,4	>0,01
19	26,0	rs13483576	27	16	4	47	2,8	>0,01
19	43,6	rs4232188	26	19	2	47	1,1	>0,01
19	56,3	rs6339594	22	24	1	47	0,1	>0,01

rote Markierung: Marker mit der stärksten Kopplung;

Mb: Megabasen; SNP: Einzelnukleotid-Polymorphismen; n: Anzahl der N2-Tiere

**Abbildung 4: Lokalisation von DNA-Markern und Kandidatengen auf Chromosom 7**

Grüner Pfeil: Lage des SNP-Markers mit der stärksten Kopplung in der Grobkartierung; rote Pfeile: Lage der bei der Feinkartierung verwendeten Mikrosatelliten; ferner ist das Kandidatengen *Umod* eingezeichnet.

1.2.2. Feinkartierung

Zur weiteren Eingrenzung der ursächlichen Mutation wurden drei polymorphe Mikrosatellitenmarker (Tabelle 12, Tabelle 13, Abbildung 4) verwendet. Hierfür wurden 31 bei der Grobkartierung verwendete mutante N2-Rückkreuzungstiere und weitere 17 als phänotypische Mutanten identifizierte N2-Mäuse sowie 34 als eindeutig identifizierte N2-Wildtypiere (Tabelle 13) untersucht. Dabei wurde die stärkste Kopplung ($\chi^2 = 48,0$) der ursächlichen Mutation zum Marker D7Mit238 bei 126,2 Mb festgestellt (<http://www.ensembl.org>; NCBI m37 mouse assembly) (Tabelle 12). Die Wahrscheinlichkeit, dass mehr als eine ENU-induzierte Mutation mit Auswirkung auf den Phänotyp in dieser chromosomalen Region existiert, ist $p < 0,001$ (KEAYS et al., 2007) (<http://www.well.ox.ac.uk/enuMutRat>).

Tabelle 12: Feinkartierung mit phänotypisch heterozygoten Mutanten der Linie HST001

Locus Chr 7 (Mb)	Mikrosatellit	Genotyp		Fehler (n)	Gesamt ph. Het (n)	χ^2
		C3H BALB/c (n)	BALB/c BALB/c (n)			
124,0	D7Mit40	31	1	16	48	28,1
126,2	D7Mit238	48	0	0	48	48,0
132,5	D7Mit68	41	2	5	48	35,4

Chr: Chromosom; Mb: Megabasen; n: Anzahl der N2-Tiere; ph. Het: phänotypische heterozygote Mutanten; rote Markierung: Marker mit der stärksten Kopplung

Tabelle 13: Feinkartierung mit phänotypischen Wildtypieren der Linie HST001

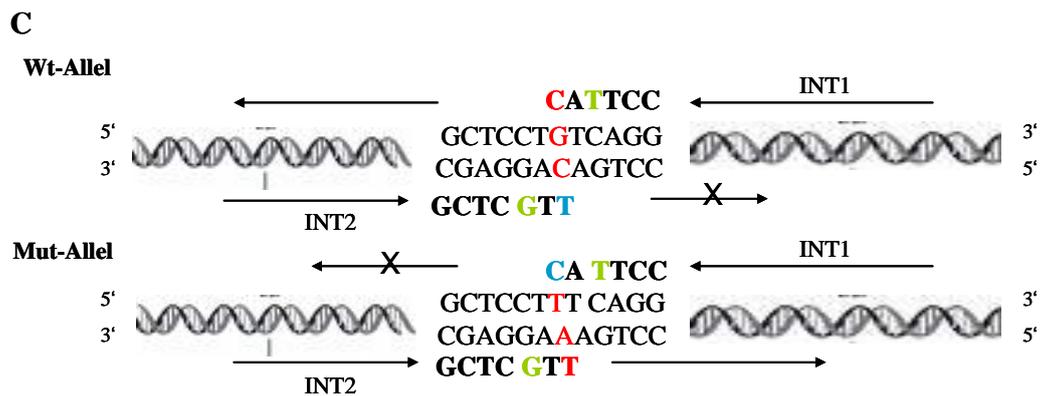
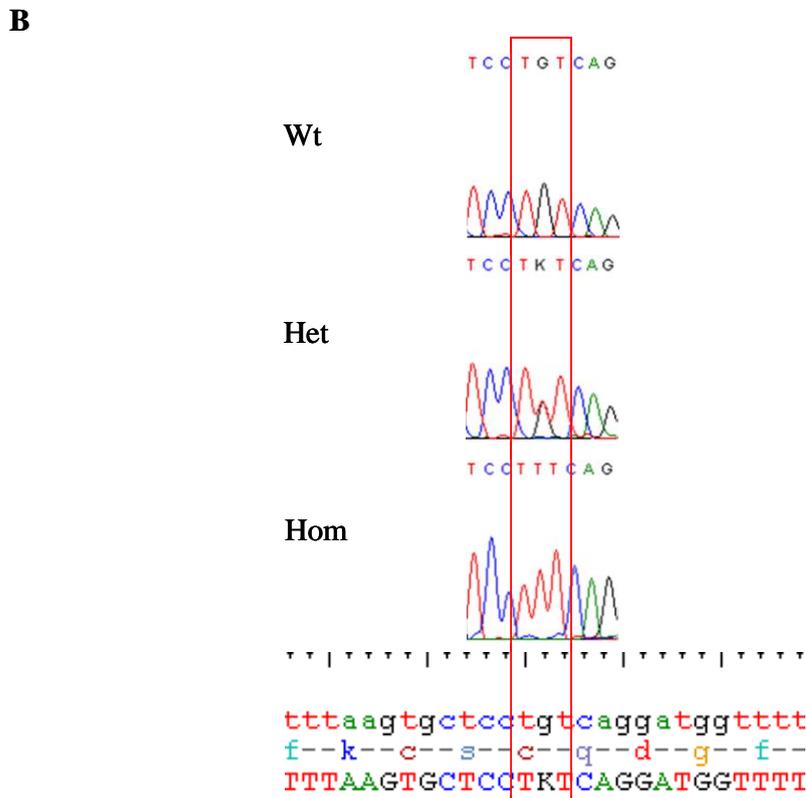
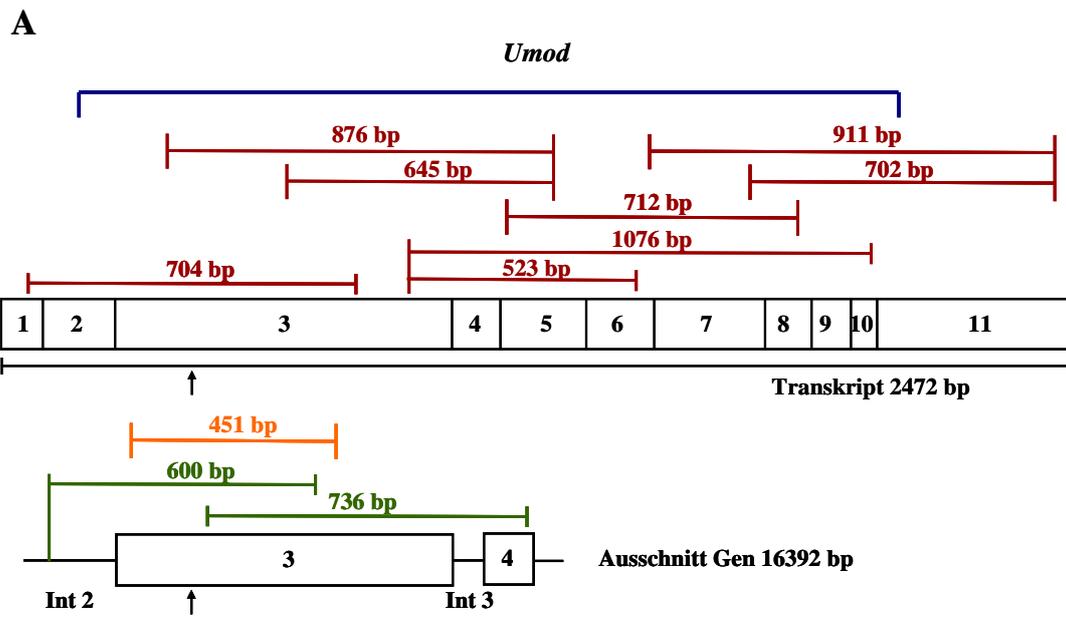
Locus Chr 7 (Mb)	Mikrosatellit	Genotyp		Fehler (n)	Gesamt ph. Wt (n)	χ^2
		C3H BALB/c (n)	BALB/c BALB/c (n)			
124,0	D7Mit40	2	32	0	34	26,5
126,2	D7Mit238	2	32	0	34	26,5
132,5	D7Mit68	2	30	2	34	24,5

Chr: Chromosom; Mb: Megabasen; n: Anzahl der N2-Tiere; ph. Wt: phänotypische Wildtypiere

1.2.3. Kandidatengenanalyse

Nach Auswahl von Uromodulin (*Umod*, 126,6 Mb, 11 Exons, 642 As) als Kandidatengen (Abbildung 4) wurde durch die Sequenzierung der cDNA (NCBI GenBank Accession-Nr. NM_009470.4; 2472 nt) (Abbildung 5A) bei phänotypischen Mutanten eine Punktmutation in Exon 3 von G zu T (nt 278 der translatierten Sequenz) identifiziert (Abbildung 5B). Die anschließende Genotypisierung von Tieren erfolgte mit Hilfe einer allelspezifischen PCR (Abbildung 5C&D).

Die identifizierte Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Cystein zu Phenylalanin auf Position 93 (C93F). Daher wurde die Linie HST001 als *Umod*^{C93F} mutante Mauslinie bezeichnet. Die Punktmutation liegt innerhalb der Kalzium-bindenden, EGF-ähnlichen Domäne II (= As 65–106) und betrifft die putative Disulfidbindung C93-C105 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q91X17>). Die Aminosäureposition C93 bei der Maus entspricht beim Menschen der Aminosäureposition C94 innerhalb der Kalzium-bindenden EGF-ähnlichen Domäne II (= As 65–107) mit Ausbildung der Disulfidbindung C94-C106 (<http://www.uniprot.org/uniprot/P07911>). Diese Region ist zwischen Säugerspezies hoch konserviert. Einige Mutationen, die Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankungen beim Menschen verursachen, wurden dort lokalisiert (Abbildung 5E).



Ferner wurden durch die Sequenzierung der *Umod*-cDNA abweichend von der Datenbankinformation (NCBI GenBank Accession-Nr. NM_009470.4) sowohl bei phänotypischen Mutanten als auch bei phänotypischen Wildtyptieren der Linie HST001 vier weitere SNPs identifiziert: 1. von A zu C (nt 7), 2. von C zu A (nt 162), 3. von T zu C (nt 436) und 4. von G zu A (nt 741). Angegeben ist jeweils das Nukleotid des translatierten Bereichs.

1.2.4. Zuchtdaten aus Anpaarungen von heterozygoten Mutanten

Aus 26 verschiedenen Anpaarungen von heterozygoten Mutanten gingen 52 Würfe mit insgesamt 237 Nachkommen hervor. 202 Tiere wurden lebend geboren, und 35 Mäuse kamen tot zur Welt oder starben kurz nach der Geburt. Von 214 Tieren wurden spätestens am Tag nach der Geburt Gewebeproben zur Genotypuntersuchung genommen. Es wurden 64 Wildtyptiere (30 %), 104 heterozygote Mutanten (49 %) und 46 homozygote Mutanten (21 %) festgestellt (Tabelle 14). Für die 214 untersuchten Tiere ergab sich eine Allelverteilung von $232 \times$ Wildtypallel und $196 \times$ mutantes Allel. Daraus errechnet sich $\chi^2 = 3,03$. Damit zeigen die Zuchtdaten keinen signifikanten Unterschied zur erwarteten Allelverteilung nach den Mendel'schen Regeln.

Tabelle 14: Nachkommen heterozygoter Mutanten der Linie HST001

	Genotyp der 214 untersuchten Tiere		
	Wt	Het	Hom
n (m/w)	64 (35/29)	104 (54/50)	46 (22/24)
%	30	49	21
davon Tote (n = 12)	2 (0/2)	7 (3/4)	3 (0/3)

Wt: Wildtyptiere; Het: heterozygote Mutanten; Hom: homozygote Mutanten;
n: Anzahl; m: männlich; w: weiblich

1.3. Untersuchung des Phänotyps

Die zur Untersuchung des Phänotyps eingesetzten Tiere wurden durch Genotypisierung in die entsprechende Untersuchungsgruppe eingeteilt. Tabelle 15 zeigt die durchgeführten Untersuchungen. Es wurden Tiere zu einem oder mehreren Zeitpunkten für die Analyse von mehreren Parametern eingesetzt.

Tabelle 15: Phänotypuntersuchungen in der Linie HST001

Untersuchung	Alter (Wo p.p.)	n	Ort
Morphologie	2	54	MVG
	35–36 ^a	40	GMC
mit Stoffwechsel	39–42 ^b	34	MTZ
	50–51	37	MTZ*
	84–99	30	MVG
Körpergewichtsentwicklung	0–20	181	MVG
Klinische Chemie des Blutes	2	51	MVG
	4	81	MVG
	7	61	MVG
	12–13	46	MVG
	35–36	39	MTZ
	84–99	30	MVG
Klinische Chemie des Blutes nach Futterentzug	36–37	40	MTZ
Hämatologie	12–13	46	MVG
	35–36	39	MTZ
Nierenfunktion im Stoffwechselkäfig*	39–42	34	MTZ
Dysmorphologie	35–36	40	GMC
Blutdruck	32–33	40	GMC
Echokardiographie	36–38	34	GMC
Nt-proANP	35–36	39	GMC

Wo p.p.: Wochen post partum; Nt-proANP: N-terminales Fragment vom Pro-atrialen natriuretischen Peptid;

*mit anschließender Harnosmolalitätsmessung und Westernblot aus den Urinproben;

^aaus der Dysmorphologieuntersuchung; ^baus der Stoffwechselkäfiguntersuchung;

GMC: German Mouse Clinic des Helmholtz Zentrums München; MTZ: klinisch-chemischer Screen

(Dr. B. Rathkolb) des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie im GMC; MTZ*: Frau Dr. E. Kemter (Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie); MVG: Moorversuchsgut Oberschleißheim

Die phänotypische Untersuchung der Linie HST001 innerhalb der „GMC“ am Helmholtz Zentrum München wurde vor der Identifizierung der ursächlichen Mutation begonnen und umfasste pro Geschlecht jeweils 20 heterozygote Mutanten und 20 Wildtypkontrolltiere im gleichen Alter (maximal eine Woche Altersunterschied). Dafür wurden 208 Nachkommen von 36 Muttertieren gezüchtet, die durch mindestens zweimalige Bestimmung des Plasmaharnstoffwertes in phänotypische Mutanten und Wildtypiere eingeteilt wurden (Tabelle 16).

Tabelle 16: Erstellung von phänotypischen Mutanten und Wildtyptieren

Blutentnahme	Phänotyp nach Plasmaharnstoffwert (mmol/l)			
	Wt (m:<10/w:<9)	Het (m:≥12/w:≥11)	nicht eindeutig (m:10–<12/w:9–<11)	
n (m/w)	n (m/w)	n (m/w)	n (m/w)	
1. Blutentnahme	208 (107/101)	84 (42/42)	74 (39/35)	50 (26/24)
2. Blutentnahme	201 (104/97)	71 (35/36)	103 (54/49)	27 (15/12)
3. Blutentnahme	68 (24/44)	16 (0/16)	43 (23/20)	9 (1/8)
Einordnung gesamt	208 (107/101)	65 (30/35)	86 (42/44)	57(35/22)

Wt: Wildtyptiere; Het: heterozygote Mutanten; n: Anzahl; m: männlich; w: weiblich

1.3.1.2. Morphologie von 35–36 Wochen alten heterozygoten Mutanten

Körpergewicht und Nasenrumpflänge wurden von 40 Tieren (männlich: 10 Wt, 10 Het; weiblich: 10 Wt, 10 Het) im Alter von 35–36 Wochen analysiert (Tabelle 18).

Im Vergleich zu den Wildtypmäusen waren das Körpergewicht und die Nasenrumpflänge bei heterozygoten Mutanten beider Geschlechter signifikant reduziert. Im Geschlechtervergleich war bei männlichen heterozygoten Mutanten das Körpergewicht signifikant und die Nasenrumpflänge moderat ($p = 0,09$) im Vergleich zu heterozygoten mutanten Weibchen erhöht. Bei den Wildtypmäusen war die Körperlänge der männlichen Tiere signifikant reduziert. Hinsichtlich des Körpergewichts wurde bei Wildtyptieren kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren festgestellt (Tabelle 18).

Tabelle 18: Morphologiedaten von 35–36 Wochen alten Mäusen

	männlich			weiblich		
	Wt n=10	Het n=10	Student's <i>t</i> -Test Het vs. Wt	Wt n=10	Het n=10	Student's <i>t</i> -Test Het vs. Wt
	MW ± SD	MW ± SD		MW ± SD	MW ± SD	
Körpergewicht (g)	38,0 ± 2,1	29,1 ± 1,1 ^c	p<0,001	36,3 ± 6,4	25,2 ± 1,6	p<0,001
Körperlänge (cm)	10,6 ± 0,2 ^b	10,2 ± 0,3	p<0,01	10,9 ± 0,3	10,0 ± 0,2	p<0,001

Alter der Mäuse: 35–36 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus;

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's *t*-Test: ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001

1.3.1.3. Morphologie und Stoffwechsel von 39–42 Wochen alten heterozygoten Mutanten

Im Stoffwechselkäfig wurden das Körpergewicht, der Körpergewichtsverlust, die Futter- und Wasseraufnahme und die Fäcesabgabe bei 34 Tieren im Alter von 39–42 Wochen analysiert (männlich: 7 Wt, 9 Het; weiblich: 8 Wt, 10 Het) (Tabelle 19).

Trotz des signifikant geringeren Körpergewichts der heterozygoten Mutanten beider Geschlechter (Abbildung 6A) war die absolute Futter- (Abbildung 6B) und Wasseraufnahme im Vergleich zu den Wildtyptieren deutlich erhöht. Auch die Kotausscheidung der Mutanten war höher (Het vs. Wt: männlich: p<0,01; weiblich: n.s.). Nach Wasserentzug für 18 Stunden war die Futterraufnahme der weiblichen heterozygot mutanten Tiere deutlich verringert, doch bezogen auf 25 g Körpergewicht immer noch signifikant erhöht. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Untersuchungen mit und ohne Wasserentzug war, dass bei Wasserentzug die Mutanten beider Geschlechter (bis zu 12,3 %) erheblich mehr an KGW verloren als die Wildtypiere (bis zu 7,2 %) (Abbildung 6D), wohingegen die Mutanten ohne Wasserentzug (bis zu 0,7 %) weniger an Gewicht verloren als die Wildtypiere (bis zu 2,7 %) (Abbildung 6C) (Tabelle 19).

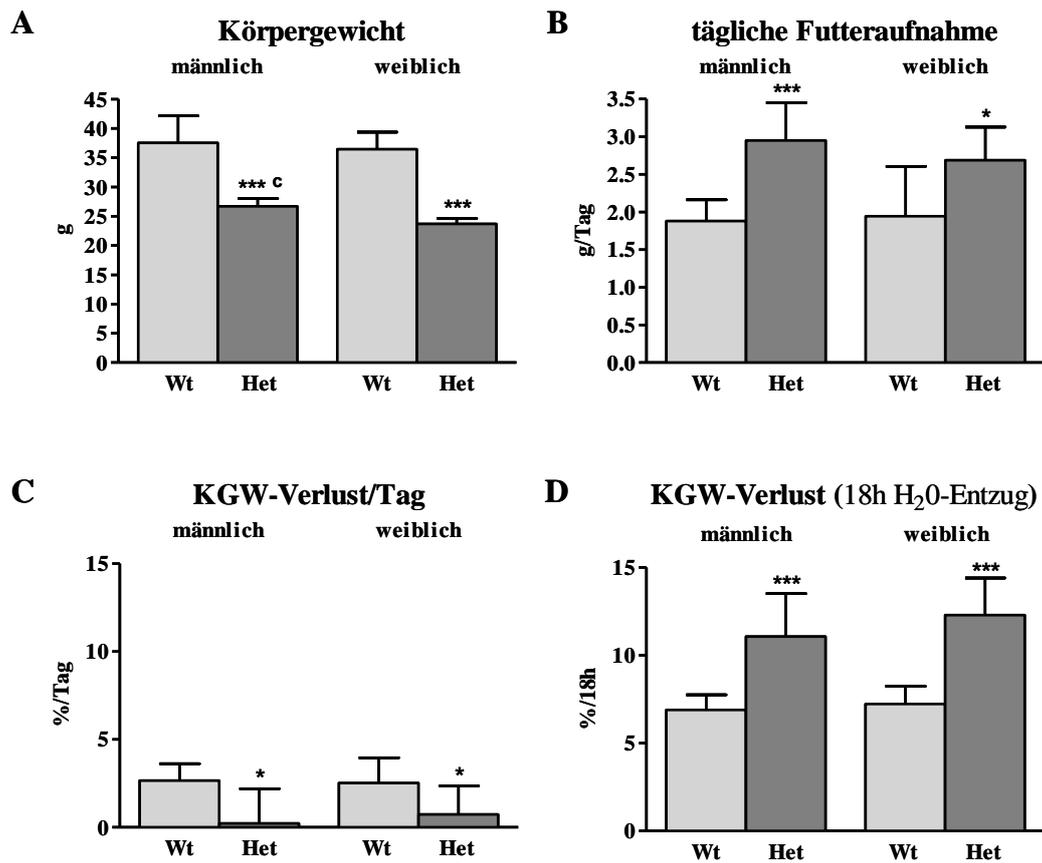


Abbildung 6: Körpergewicht, Körpergewichtsverlust und Futteraufnahme von 39–42 Wochen alten Mäusen

(A) Das Körpergewicht heterozygoter Mutanten ist verglichen mit den Wildtyptieren hochgradig reduziert, obwohl (B) die Futteraufnahme signifikant erhöht ist. (C) Der tägliche Körpergewichtsverlust von heterozygot mutanten Tieren ist geringer als bei Wildtypmäusen, doch bei (D) Wasserentzug von 18 Stunden ist der Körpergewichtsverlust signifikant erhöht. (A–D) Anzahl der Mäuse: 7–10 pro Genotyp und Geschlecht; Mittelwerte + Standardabweichungen; Wt: Wildtyptiere; Het: heterozygote Mutanten; ^a, ^b, ^c Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, *, **, *** Mutanten verglichen mit Wildtyptieren, Student's *t*-Test: * ^a $p < 0,05$, ** ^b $p < 0,01$, *** ^c $p < 0,001$; (C&D) KGW: Körpergewicht; h: Stunde

1.3.1.4. Morphologie von 50–51 Wochen alten heterozygoten Mutanten

Die Analyse von Körper-, Karkassen- (= Tierkörper ohne Fell, innere Organe, Kopf, Schwanz und sichtbares Fett) und Organengewichten von Nieren, Leber, Milz, Herz, Lunge, Magen und Harnblase wurden an 37 Tieren (männlich: 9 Wt, 9 Het; weiblich: 8 Wt, 11 Het) im Alter von 50–51 Wochen durchgeführt (Tabelle 20).

Im Vergleich zu den Wildtypkontrollen hatten heterozygot mutante Mäuse beider Geschlechter sowohl ein signifikant reduziertes Körpergewicht (Abbildung 7; diese Tiere gehörten nicht zu der untersuchten Gruppe) wie auch ein signifikant reduziertes Karkassengewicht. Bezogen auf das Körpergewicht waren bei männlichen heterozygoten

Mutanten alle relativen Organgewichte erhöht, signifikant für Nieren, Herz, Lunge, Magen und Harnblase. Bei weiblichen heterozygot mutanten Tieren waren alle relativen Organgewichte signifikant erhöht. Bezogen auf das Karkassengewicht waren bei männlichen heterozygoten Mutanten die relativen Organgewichte von Nieren und Magen signifikant erhöht und von Leber und Herz signifikant reduziert. Bei den weiblichen heterozygot mutanten Mäusen waren die relativen Organgewichte von Nieren, Magen und Harnblase signifikant erhöht. Signifikant reduziert war das relative Organgewicht der Leber. Während im Geschlechtervergleich das Körper- und Karkassengewicht der männlichen heterozygoten Mutanten im Vergleich zu den weiblichen heterozygoten Mutanten signifikant erhöht war, war bei den Wildtyptieren das Karkassengewicht bei den männlichen Mäusen signifikant erhöht (Tabelle 20).

Tabelle 20: Morphologiedaten von 50–51 Wochen alten Mäusen

	männlich				weiblich			
	Student's <i>t</i> -Test		Student's <i>t</i> -Test		Student's <i>t</i> -Test		Student's <i>t</i> -Test	
	Wt	Het	Wt	Het	Wt	Het	Wt	Het
	n=9	n=9	n=8	n=11				
	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD
KGW (g)	42,0 ± 3,9	28,8 ± 1,2 ^c	42,9 ± 3,1	24,8 ± 1,3	42,9 ± 3,1	24,8 ± 1,3	42,9 ± 3,1	24,8 ± 1,3
Karkasse (g)	13,5 ± 0,9 ^a	10,8 ± 0,5 ^c	12,5 ± 0,3	9,5 ± 0,5	12,5 ± 0,3	9,5 ± 0,5	12,5 ± 0,3	9,5 ± 0,5
Nieren (mg)	676 ± 59 ^c	601 ± 36 ^c	414 ± 35	423 ± 29	414 ± 35	423 ± 29	414 ± 35	423 ± 29
Leber (mg)	1804 ± 211	1259 ± 115 ^b	1644 ± 198	1086 ± 86	1644 ± 198	1086 ± 86	1644 ± 198	1086 ± 86
Milz (mg)	108 ± 26	79 ± 6 ^c	131 ± 20	103 ± 17	131 ± 20	103 ± 17	131 ± 20	103 ± 17
Herz (mg)	157 ± 13 ^c	120 ± 7 ^c	131 ± 12	102 ± 8	131 ± 12	102 ± 8	131 ± 12	102 ± 8
Lunge (mg)	190 ± 51	169 ± 31	202 ± 20	156 ± 12	202 ± 20	156 ± 12	202 ± 20	156 ± 12
Magen (mg)	241 ± 23	230 ± 15	256 ± 20	230 ± 16	256 ± 20	230 ± 16	256 ± 20	230 ± 16
Harnblase (mg)	36 ± 5 ^c	31 ± 5 ^c	22 ± 2	21 ± 2	22 ± 2	21 ± 2	22 ± 2	21 ± 2
Nierengewicht/KGW (%)	1,6 ± 0,2 ^c	2,1 ± 0,1 ^c	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Lebergewicht/KGW (%)	4,3 ± 0,2	4,4 ± 0,4	3,9 ± 0,6	4,4 ± 0,2	3,9 ± 0,6	4,4 ± 0,2	3,9 ± 0,6	4,4 ± 0,2
Milzgewicht/KGW (%)	0,26 ± 0,04 ^a	0,27 ± 0,02 ^c	0,31 ± 0,04	0,41 ± 0,06	0,31 ± 0,04	0,41 ± 0,06	0,31 ± 0,04	0,41 ± 0,06
Herzgewicht/KGW (%)	0,37 ± 0,01 ^c	0,42 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,41 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,41 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,41 ± 0,02
Lungengewicht/KGW (%)	0,45 ± 0,10	0,59 ± 0,10	0,47 ± 0,07	0,63 ± 0,05	0,47 ± 0,07	0,63 ± 0,05	0,47 ± 0,07	0,63 ± 0,05
Magengewicht/KGW (%)	0,6 ± 0,03	0,8 ± 0,04 ^c	0,6 ± 0,06	0,9 ± 0,06	0,6 ± 0,06	0,9 ± 0,06	0,6 ± 0,06	0,9 ± 0,06
Harnblasengewicht/KGW (%)	0,08 ± 0,01 ^c	0,11 ± 0,02 ^b	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Nierengewicht/Karkasse (%)	5,0 ± 0,4 ^c	5,6 ± 0,3 ^c	3,3 ± 0,2	4,4 ± 0,2	3,3 ± 0,2	4,4 ± 0,2	3,3 ± 0,2	4,4 ± 0,2
Lebergewicht/Karkasse (%)	13,3 ± 0,8	11,7 ± 1,2	13,1 ± 1,4	11,4 ± 0,8	13,1 ± 1,4	11,4 ± 0,8	13,1 ± 1,4	11,4 ± 0,8
Milzgewicht/Karkasse (%)	0,80 ± 0,15 ^b	0,73 ± 0,05 ^c	1,04 ± 0,13	1,08 ± 0,18	1,04 ± 0,13	1,08 ± 0,18	1,04 ± 0,13	1,08 ± 0,18
Herzgewicht/Karkasse (%)	1,16 ± 0,04 ^c	1,12 ± 0,05	1,04 ± 0,07	1,07 ± 0,06	1,04 ± 0,07	1,07 ± 0,06	1,04 ± 0,07	1,07 ± 0,06
Lungengewicht/Karkasse (%)	1,4 ± 0,33	1,6 ± 0,29	1,6 ± 0,17	1,6 ± 0,12	1,6 ± 0,17	1,6 ± 0,12	1,6 ± 0,17	1,6 ± 0,12
Magengewicht/Karkasse (%)	1,8 ± 0,09 ^c	2,1 ± 0,12 ^b	2,0 ± 0,12	2,4 ± 0,21	2,0 ± 0,12	2,4 ± 0,21	2,0 ± 0,12	2,4 ± 0,21
Harnblasengewicht/Karkasse (%)	0,26 ± 0,02 ^c	0,29 ± 0,05 ^c	0,17 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,22 ± 0,02

Alter der Mäuse: 50–51 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus; KGW: Körpergewicht; MW: Mittelwert;

SD: Standardabweichung; ^{a,b,c}: Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's *t*-Test: ^a p<0,05, ^b p<0,01, ^c p<0,001; n.s.: nicht signifikant



Abbildung 7: Körpergewichtsunterschied von 56 Wochen alten Mäusen

Beispiel für den Körpergewichtsunterschied zwischen männlichen heterozygoten Mutanten und Wildtypen im Alter von einem Jahr; Wt: Wildtyp; Het: heterozygoter Mutant

1.3.1.5. Morphologie von 84–99 Wochen alten heterozygoten Mutanten

Die Analyse von Körper-, Karkassen- und Organgewichten wurden bei 30 Tieren (männlich: 8 Wt, 10 Het; weiblich: 7 Wt, 5 Het) im Alter von 84–99 Wochen durchgeführt (Tabelle 21).

Wie bei den 50–51 Wochen alten Mäusen war bei den 84–99 Wochen alten heterozygoten Mutanten beider Geschlechter im Vergleich zu den Wildtypen das Körper- und Karkassengewicht signifikant reduziert. Bezogen auf das Körpergewicht waren alle relativen Organgewichte, bis auf die Leber, erhöht, signifikant für Nieren und Magen, moderat für Lunge ($p = 0,07$) und nicht signifikant für Milz, Herz und Harnblase. Bezogen auf das Karkassengewicht waren die relativen Organgewichte von Nieren und Magen signifikant erhöht. Bei weiblichen heterozygot mutanten Mäusen waren die relativen Organgewichte bezogen auf das Körper- und Karkassengewicht von Nieren, Magen und Harnblase signifikant erhöht (Tabelle 21).

Tabelle 21: Morphologiedaten von 84–99 Wochen alten Mäusen

	männlich				weiblich			
	Wt		Het		Wt		Het	
	MW ± SD	n	MW ± SD	n	MW ± SD	n	MW ± SD	n
KGW (g)	38,8 ± 5,0 ^a	8	27,8 ± 1,4	10	33,5 ± 4,1	7	28,3 ± 2,4	5
Karkasse (g)	15,1 ± 1,4 ^c		11,0 ± 0,8		12,1 ± 0,6		10,6 ± 0,7	
Nieren (mg)	703 ± 93 ^c		589 ± 53 ^c		378 ± 30		415 ± 36	
Leber (mg)	2194 ± 631 ^a		1443 ± 138		1582 ± 103		1393 ± 113	
Milz (mg)	99 ± 32 ^a		78 ± 14 ^b		139 ± 35		111 ± 18	
Herz (mg)	177 ± 25 ^b		129 ± 10 ^a		137 ± 11		116 ± 12	
Lunge (mg)	214 ± 27		164 ± 11		206 ± 21		165 ± 15	
Magen (mg)	275 ± 46		270 ± 30		284 ± 24		295 ± 13	
Harnblase (mg)	44 ± 14 ^b		40 ± 18		24 ± 3		32 ± 6	
Nierengewicht/KGW (%)	1,8 ± 0,2 ^c		2,1 ± 0,2 ^c		1,1 ± 0,1		1,5 ± 0,1	
Lebergewicht/KGW (%)	5,7 ± 1,4		5,2 ± 0,5		4,8 ± 0,5		4,9 ± 0,3	
Milzgewicht/KGW (%)	0,26 ± 0,08 ^b		0,28 ± 0,06 ^a		0,41 ± 0,07		0,40 ± 0,10	
Herzgewicht/KGW (%)	0,46 ± 0,04		0,47 ± 0,03 ^b		0,42 ± 0,06		0,41 ± 0,04	
Lungengewicht/KGW (%)	0,55 ± 0,04		0,59 ± 0,04		0,62 ± 0,08		0,58 ± 0,06	
Magengewicht/KGW (%)	0,7 ± 0,13 ^a		1,0 ± 0,10		0,9 ± 0,06		1,1 ± 0,06	
Harnblasengewicht/KGW (%)	0,11 ± 0,03 ^b		0,14 ± 0,07		0,07 ± 0,01		0,11 ± 0,02	
Nierengewicht/Karkasse (%)	4,7 ± 0,5 ^c		5,4 ± 0,6 ^c		3,1 ± 0,1		3,9 ± 0,4	
Lebergewicht/Karkasse (%)	14,4 ± 3,4		13,2 ± 1,6		13,1 ± 0,6		13,2 ± 1,6	
Milzgewicht/Karkasse (%)	0,65 ± 0,18 ^b		0,71 ± 0,17 ^b		1,15 ± 0,30		1,05 ± 0,19	
Herzgewicht/Karkasse (%)	1,17 ± 0,10		1,18 ± 0,09		1,14 ± 0,09		1,09 ± 0,09	
Lungengewicht/Karkasse (%)	1,4 ± 0,11 ^c		1,5 ± 0,17		1,7 ± 0,14		1,6 ± 0,16	
Magengewicht/Karkasse (%)	1,8 ± 0,32 ^b		2,5 ± 0,37		2,4 ± 0,19		2,8 ± 0,23	
Harnblasengewicht/Karkasse (%)	0,29 ± 0,07 ^b		0,37 ± 0,20		0,20 ± 0,03		0,30 ± 0,07	

Alter der Mäuse: 84–99 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus; KGW: Körpergewicht; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's *t*-Test: ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001; n.s.: nicht signifikant

1.3.1.6. Körpergewichtsentwicklung

Um zu beurteilen, ab welchem Zeitpunkt signifikante Unterschiede im Körpergewicht zwischen Mutanten und Wildtyptieren auftreten, wurde die Körpergewichtsentwicklung durch wöchentliches Wiegen ab dem Tag der Geburt oder Tag 1 p.p. bis zu 20 Wochen p.p. bei 181–47 Mäusen (männlich: 30–8 Wt, 48–11 Het, 16–10 Hom; weiblich: 23–5 Wt, 43–6 Het, 21–6 Hom) untersucht (Tabelle 22).

Beim Geburtsgewicht zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Mutanten und gleichgeschlechtlichen Wildtyptieren. Im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren reduzierte sich bei den männlichen homozygot mutanten Tieren das Körpergewicht moderat ab vier Wochen p.p. ($p = 0,06$) und signifikant ab fünf Wochen p.p.. Die männlichen heterozygoten Mutanten wogen ab drei Wochen p.p. signifikant weniger als die Wildtyptiere. Bei den weiblichen homozygoten Mutanten war im Vergleich zu den Wildtyptieren das Körpergewicht mit vier Lebenswochen ($p = 0,05$) moderat und ab fünf Lebenswochen signifikant verringert. Die weiblichen heterozygot mutanten Mäuse waren ab sieben Wochen p.p. signifikant leichter als die Wildtypmäuse. Im Vergleich zu den heterozygoten Mutanten stellte sich ein signifikanter Gewichtsverlust der männlichen homozygoten Mutanten mit 18 Wochen p.p. und der weiblichen homozygoten Mutanten mit vier Wochen p.p. ein. Zwischen den Geschlechtern hatten die männlichen homozygoten Mutanten und die männlichen Wildtyptiere ab Geburt und die männlichen heterozygoten Mutanten ab vier Wochen p.p. im Vergleich zu den weiblichen Tieren ein signifikant höheres Körpergewicht (Tabelle 22) (Abbildung 8A). Abbildung 8B zeigt beispielhaft den Körpergewichtsunterschied zwischen weiblichen homozygoten Mutanten und Kontrolltieren 16 Wochen p.p..

Tabelle 22: Körpergewichtsentwicklung der Linie HST001 bis 20 Wochen p.p.

Wochen	männlich										weiblich																				
	Wt					Het					Hom					Wt					Het					Hom					
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n	MW
0	1,65	± 0,3 ^a	30	1,56	± 0,3	48	1,70	± 0,2 ^c	16	n.s.	n.s.	p=0,093	1,45	± 0,2	23	1,54	± 0,2	43	1,40	± 0,3	21	n.s.	n.s.	p=0,060	1,40	± 0,3	21	n.s.	n.s.	p<0,05	
1	5,3	± 0,8 ^b	27	5,1	± 0,9	45	5,4	± 0,5 ^b	16	n.s.	n.s.	n.s.	4,5	± 1,0	22	5,0	± 0,9	40	4,8	± 0,7	20	n.s.	n.s.	n.s.	4,8	± 0,7	20	n.s.	n.s.	n.s.	
2	8,5	± 1,4 ^b	27	8,1	± 1,4	45	8,5	± 0,8 ^b	14	n.s.	n.s.	n.s.	7,3	± 1,1	21	7,9	± 1,5	40	7,4	± 1,2	19	n.s.	n.s.	n.s.	7,4	± 1,2	19	n.s.	n.s.	n.s.	
3	13,3	± 3,4 ^b	18	11,6	± 2,2	29	11,9	± 0,8 ^c	11	n.s.	p<0,05	n.s.	10,3	± 2,1	14	10,6	± 1,9	27	9,7	± 1,7	12	n.s.	n.s.	n.s.	9,7	± 1,7	12	n.s.	n.s.	n.s.	
4	19,0	± 2,5 ^c	18	17,1	± 2,4 ^c	29	17,3	± 1,6 ^c	11	p=0,058	p<0,05	n.s.	14,7	± 2,0	14	14,8	± 1,7	29	13,2	± 1,9	12	p=0,052	n.s.	n.s.	13,2	± 1,9	12	p=0,052	n.s.	p<0,01	
5	21,8	± 1,9 ^c	18	19,9	± 2,1 ^c	29	19,5	± 1,6 ^c	11	p<0,01	p<0,01	n.s.	17,8	± 1,8	14	17,6	± 1,4	29	16,0	± 1,6	12	p<0,05	n.s.	n.s.	16,0	± 1,6	12	p<0,05	n.s.	p<0,01	
6	23,1	± 1,6 ^c	18	21,0	± 1,9 ^c	29	20,4	± 1,4 ^c	11	p<0,001	p<0,001	n.s.	19,2	± 2,1	14	18,6	± 1,4	29	17,2	± 1,3	12	p<0,01	n.s.	n.s.	17,2	± 1,3	12	p<0,01	n.s.	p<0,01	
7	24,3	± 1,5 ^c	18	21,9	± 1,8 ^c	29	21,2	± 1,4 ^c	11	p<0,001	p<0,001	n.s.	20,5	± 1,8	14	19,3	± 1,4	29	17,7	± 1,3	12	p<0,001	p<0,05	p<0,01	17,7	± 1,3	12	p<0,001	p<0,05	p<0,01	
8	25,1	± 1,6 ^c	18	22,5	± 1,8 ^c	29	21,4	± 1,9 ^c	11	p<0,001	p<0,001	p=0,099	21,1	± 2,4	14	19,5	± 1,3	29	17,9	± 1,5	12	p<0,001	p<0,01	p<0,01	17,9	± 1,5	12	p<0,001	p<0,01	p<0,01	
9	25,9	± 1,6 ^c	18	23,4	± 1,3 ^c	28	22,7	± 2,1 ^c	11	p<0,001	p<0,001	n.s.	21,7	± 2,3	14	20,1	± 1,3	25	18,4	± 1,6	12	p<0,001	p<0,01	p<0,01	18,4	± 1,6	12	p<0,001	p<0,01	p<0,01	
10	26,5	± 1,8 ^c	18	23,4	± 2,0 ^c	29	22,9	± 1,8 ^c	11	p<0,001	p<0,001	n.s.	22,6	± 2,5	13	20,8	± 1,5	25	18,8	± 1,5	12	p<0,001	p<0,01	p<0,01	18,8	± 1,5	12	p<0,001	p<0,01	p<0,001	
11	27,3	± 1,5 ^c	17	24,0	± 1,9 ^c	29	23,6	± 1,6 ^c	10	p<0,001	p<0,001	n.s.	23,6	± 2,4	13	21,1	± 1,5	25	19,1	± 1,5	12	p<0,001	p<0,001	p<0,001	19,1	± 1,5	12	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
12	27,8	± 1,8 ^c	17	24,4	± 1,9 ^c	28	23,9	± 1,7 ^c	10	p<0,001	p<0,001	n.s.	23,6	± 2,3	13	21,5	± 1,6	25	19,3	± 1,5	12	p<0,001	p<0,01	p<0,01	19,3	± 1,5	12	p<0,001	p<0,01	p<0,001	
13	28,4	± 1,8 ^c	17	24,8	± 2,0 ^c	25	24,3	± 1,6 ^c	10	p<0,001	p<0,001	n.s.	24,0	± 3,0	13	22,4	± 1,9	22	19,9	± 1,9	10	p<0,001	p=0,060	p<0,01	19,9	± 1,9	10	p<0,001	p=0,060	p<0,01	
14	29,0	± 1,8 ^c	15	25,5	± 2,1 ^c	19	24,4	± 1,9 ^c	10	p<0,001	p<0,001	n.s.	24,3	± 3,1	8	22,7	± 1,2	19	19,7	± 2,2	9	p<0,01	p=0,055	p<0,001	19,7	± 2,2	9	p<0,01	p=0,055	p<0,001	
15	29,2	± 2,0 ^b	15	25,5	± 2,2 ^c	19	24,8	± 1,5 ^c	10	p<0,001	p<0,001	n.s.	25,3	± 3,1	8	22,9	± 1,2	19	19,9	± 1,7	9	p<0,001	p<0,01	p<0,001	19,9	± 1,7	9	p<0,001	p<0,01	p<0,001	
16	29,9	± 1,9 ^a	13	26,6	± 0,9 ^c	16	25,4	± 2,6 ^c	10	p<0,001	p<0,001	p=0,081	27,2	± 1,6	5	23,2	± 1,2	17	19,8	± 1,8	8	p<0,001	p<0,001	p<0,001	19,8	± 1,8	8	p<0,001	p<0,001	p<0,001	
17	30,4	± 1,6 ^b	11	27,3	± 3,1 ^c	16	25,3	± 1,7 ^c	10	p<0,001	p<0,01	p=0,074	26,5	± 3,0	6	23,1	± 1,4	13	20,2	± 2,3	6	p<0,01	p<0,01	p<0,01	20,2	± 2,3	6	p<0,01	p<0,01	p<0,01	
18	31,0	± 1,7 ^a	9	27,2	± 0,8 ^c	15	25,4	± 2,0 ^c	10	p<0,001	p<0,001	p<0,01	27,7	± 2,9	6	23,3	± 1,3	9	20,3	± 2,0	6	p<0,001	p<0,01	p<0,01	20,3	± 2,0	6	p<0,001	p<0,01	p<0,01	
19	31,8	± 1,9 ^a	8	27,7	± 0,7 ^c	11	26,0	± 2,1 ^c	10	p<0,001	p<0,001	p<0,05	27,6	± 3,6	6	23,3	± 1,7	6	20,6	± 1,7	6	p<0,01	p<0,05	p<0,05	20,6	± 1,7	6	p<0,01	p<0,05	p<0,05	
20	32,0	± 2,1 ^a	8	27,6	± 0,7 ^c	11	25,9	± 2,0 ^c	10	p<0,001	p<0,001	p<0,05	27,4	± 3,8	6	23,3	± 1,5	6	20,5	± 2,1	6	p<0,01	p<0,05	p<0,05	20,5	± 2,1	6	p<0,01	p<0,05	p<0,05	

Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; Hom: homozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus;

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's *t*-Test: ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001; n.s.: nicht signifikant

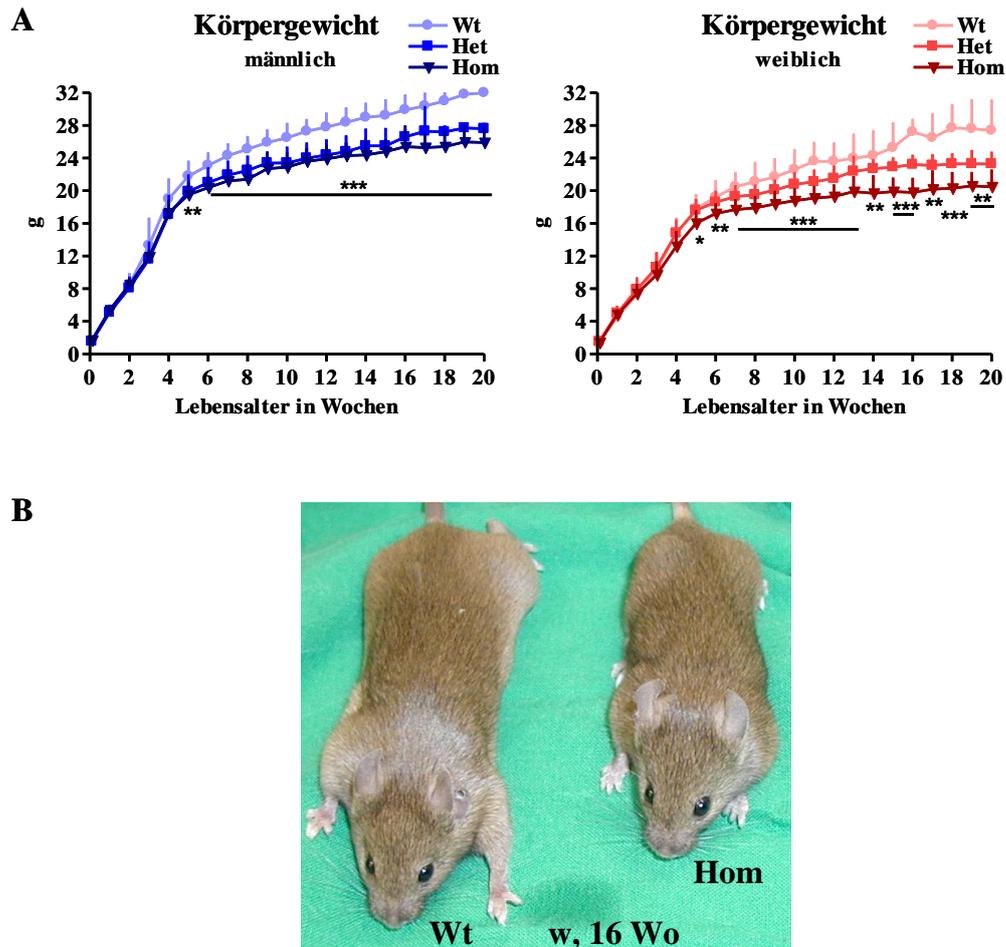


Abbildung 8: Körpergewichtsentwicklung bis zu 20 Wochen p.p.

(A) Körpergewichtsentwicklung heterozygoter Mutanten und homozygoter Mutanten ab Geburt bis einschließlich 20 Wochen p.p. im Vergleich zu Wildtypieren; Mittelwerte + Standardabweichungen; Anzahl der Mäuse: 5-48; *, **, *** homozygote Mutanten verglichen mit Wildtypen, Student's *t*-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (B) Beispiel für den Körpergewichtsunterschied zwischen einer weiblichen homozygoten Mutante und der Kontrollmaus im Alter von 16 Wochen. (A&B) Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; Hom: homozygote Mutanten.

1.3.2. Klinische Chemie und Hämatologie

1.3.2.1. Blutdaten von 2 Wochen alten mutanten Mäusen

Die klinisch-chemische Untersuchung des Blutes wurde bei 51 Mäusen (männlich: 9 Wt, 15 Het, 5 Hom; weiblich: 7 Wt, 9 Het, 6 Hom) im Alter von 14 Tagen durchgeführt (Tabelle 23).

Im Vergleich zu den Wildtypmäusen waren bei männlichen homozygot mutanten Tieren die Harnstoff-, Kalium- und Chloridkonzentrationen im Plasma signifikant erhöht. Bei weiblichen homozygoten Tieren war die Plasmaharnstoffkonzentration signifikant erhöht. Im Vergleich zu den heterozygoten Mutanten waren bei männlichen homozygoten Mutanten die Plasmakonzentrationen von Harnstoff, Natrium und Chlorid signifikant und von

Gesamtprotein ($p = 0,06$) moderat erhöht. Bei weiblichen homozygot mutanten Tieren war die Konzentration von Plasmaharnstoff signifikant erhöht. Ein Geschlechtsdimorphismus wurde bei der Plasmakonzentration von Kreatinin bei den Wildtyptieren nachgewiesen (Tabelle 23). Die nähere Betrachtung des Parameters Harnstoff zeigte, dass der Mittelwert der männlichen homozygoten Mutanten ($12,1 \text{ mmol/l} \triangleq 73 \text{ mg/dl}$) erheblich höher lag als bei den Wildtyptieren ($8,7 \text{ mmol/l} \triangleq 52 \text{ mg/dl}$). Die Spanne der Werte lag bei den Wildtypmäusen zwischen $6,8 \text{ mmol/l} \triangleq 41 \text{ mg/dl}$ und $10,9 \text{ mmol/l} \triangleq 65 \text{ mg/dl}$ und bei den männlichen homozygoten Mutanten zwischen $10,2 \text{ mmol/l} \triangleq 61 \text{ mg/dl}$ und $14,3 \text{ mmol/l} \triangleq 86 \text{ mg/dl}$. Auch bei den weiblichen homozygot mutanten Tieren lag der Plasmaharnstoff im Mittelwert ($12,3 \text{ mmol/l} \triangleq 74 \text{ mg/dl}$) deutlich über dem Mittelwert der Wildtyptiere ($9,4 \text{ mmol/l} \triangleq 56 \text{ mg/dl}$). Die Schwankungsbreite bei den weiblichen Wildtyptieren lag zwischen $6,4 \text{ mmol/l} \triangleq 39 \text{ mg/dl}$ und $12,6 \text{ mmol/l} \triangleq 76 \text{ mg/dl}$ und bei den homozygoten Mutanten zwischen $10,3 \text{ mmol/l} \triangleq 62 \text{ mg/dl}$ und $14,7 \text{ mmol/l} \triangleq 88 \text{ mg/dl}$ (Abbildung 9).

Tabelle 23: Blutplasmadaten von 2 Wochen alten Mäusen

	männlich						weiblich								
	Wt			Het			Hom			Het			Hom		
	MW ± SD	n	Student's t-Test	MW ± SD	n	Student's t-Test	MW ± SD	n	Student's t-Test	MW ± SD	n	Student's t-Test	MW ± SD	n	Student's t-Test
Na ⁺ (mmol/l)	142 ± 5	n=8-9		141 ± 4	n=13-15		147 ± 6	n=5		143 ± 2	n=8-9		145 ± 4	n=4(K ⁺)-6	
K ⁺ (mmol/l)	4,5 ± 0,5			4,5 ± 0,6			5,0 ± 0,2			4,6 ± 0,8			4,9 ± 0,4		
Cl ⁻ (mmol/l)	107 ± 3			106 ± 3			112 ± 3			107 ± 3			110 ± 4		
Gesamtprotein (g/l)	40 ± 3			39 ± 2			41 ± 2			39 ± 2			40 ± 1		
Kreatinin (µmol/l)	13,0 ± 1,3 ^a			13,9 ± 2,9			14,0 ± 3,6			14,6 ± 2,8			14,9 ± 3,4		
Harnstoff (mmol/l)	8,7 ± 1,6			9,0 ± 1,1			12,1 ± 1,6			9,3 ± 0,8			12,3 ± 1,6		
Harnsäure (µmol/l)	99 ± 12			102 ± 27			82 ± 53			116 ± 31			115 ± 44		

Alter der Mäuse: 2 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; Hom: homozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus; TP: Gesamtprotein; HS: Harnsäure;

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a,b,c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's t-Test: ^a p<0,05, ^b p<0,01, ^c p<0,001; n.s.: nicht signifikant

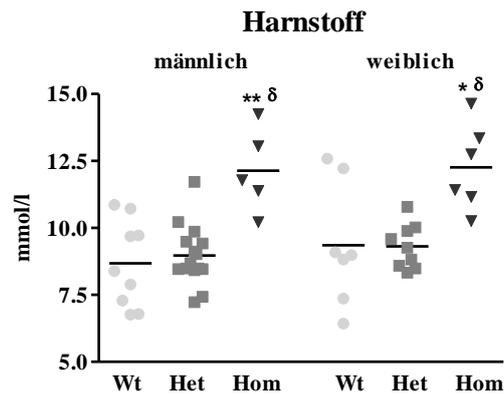


Abbildung 9: Plasmaharnstoff von 2 Wochen alten Mäusen

Mittelwerte + Einzelwerte; Anzahl der Mäuse: 5–15 pro Genotyp und Geschlecht; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; Hom: homozygote Mutanten; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, *, **, *** Mutanten verglichen mit Wildtypieren, ^{α, β, δ} heterozygote Mutanten verglichen mit homozygoten Mutanten, Student's *t*-Test: * ^a $p < 0,05$, ** ^b $p < 0,01$, *** ^c $p < 0,001$

1.3.2.2. Blutdaten von 4 Wochen alten mutanten Mäusen

Die klinisch-chemische Untersuchung des Blutes wurde an 81 Tieren (männlich: 11 Wt, 24 Het, 8 Hom; weiblich: 13 Wt, 18 Het, 7 Hom) im Alter von 28 Tagen durchgeführt (Tabelle 24).

Im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren waren bei männlichen homozygoten Mutanten die Plasmakonzentrationen von Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, Natrium und Gesamtprotein signifikant sowie von Chlorid ($p = 0,09$) moderat erhöht, und bei männlichen heterozygoten Mutanten war die Plasmaharnstoffkonzentration ($p = 0,07$) moderat erhöht. Bei weiblichen homozygoten Mutanten waren die Plasmawerte von Harnstoff sowie Gesamtprotein signifikant und von Harnsäure ($p = 0,08$) moderat erhöht. Die Kaliumkonzentration im Plasma hingegen war signifikant erniedrigt. Die weiblichen heterozygoten Mutanten hatten signifikant erniedrigte Plasmawerte für Natrium und Chlorid. Im Vergleich zu den heterozygoten Mutanten waren bei männlichen homozygoten mutanten Mäusen die Konzentrationen von Harnstoff sowie Gesamtprotein im Plasma signifikant und von Natrium ($p = 0,07$) moderat erhöht. Bei weiblichen homozygoten Mutanten waren die Plasmakonzentrationen von Harnstoff wie Natrium signifikant und von Chlorid ($p = 0,07$) moderat erhöht. Einen signifikanten Geschlechtsdimorphismus zeigten die Parameter Natrium und Chlorid bei Wildtypieren (Tabelle 24).

Tabelle 24: Blutplasmadaten von 4 Wochen alten Mäusen

	weiblich													
	männlich					weiblich								
	Student's <i>t</i> -Test			Student's <i>t</i> -Test			Student's <i>t</i> -Test		Student's <i>t</i> -Test		Student's <i>t</i> -Test			
Wt	Het	Hom	Wt	Het	Hom	Wt	Het	Hom	Wt	Het	Hom	Wt	Het	Hom
n=11	n=24	n=8	n=13	n=18	n=7	n=13	n=18	n=7	n=13	n=18	n=7	n=13	n=18	n=7
MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD
Na ⁺ (mmol/l)	142 ± 5 ^b	145 ± 7	150 ± 7	148 ± 4	144 ± 5	148 ± 4	144 ± 5	149 ± 2	148 ± 4	144 ± 5	149 ± 2	148 ± 4	144 ± 5	149 ± 2
K ⁺ (mmol/l)	4,2 ± 0,3	4,3 ± 0,5	4,5 ± 0,4	4,4 ± 0,2	4,3 ± 0,4	4,4 ± 0,2	4,3 ± 0,4	4,2 ± 0,2	4,4 ± 0,2	4,3 ± 0,4	4,2 ± 0,2	4,4 ± 0,2	4,3 ± 0,4	4,2 ± 0,2
Cl ⁻ (mmol/l)	108 ± 4 ^b	109 ± 4	111 ± 4	113 ± 3	109 ± 3	113 ± 3	109 ± 3	112 ± 2	113 ± 3	109 ± 3	112 ± 2	113 ± 3	109 ± 3	112 ± 2
Gesamtprotein (g/l)	46 ± 3	47 ± 2	50 ± 2	47 ± 2	48 ± 2	47 ± 2	48 ± 2	49 ± 2	47 ± 2	48 ± 2	49 ± 2	47 ± 2	48 ± 2	49 ± 2
Kreatinin (µmol/l)	7,4 ± 2,4	9,2 ± 3,7	10,9 ± 3,5	9,2 ± 3,4	8,8 ± 3,0	9,2 ± 3,4	8,8 ± 3,0	9,0 ± 3,4	9,2 ± 3,4	8,8 ± 3,0	9,0 ± 3,4	9,2 ± 3,4	8,8 ± 3,0	9,0 ± 3,4
Harnstoff (mmol/l)	7,6 ± 0,9	8,7 ± 1,9	11,7 ± 1,4	8,7 ± 2,5	8,4 ± 2,5	8,7 ± 2,5	8,4 ± 2,5	12,6 ± 2,4	8,7 ± 2,5	8,4 ± 2,5	12,6 ± 2,4	8,7 ± 2,5	8,4 ± 2,5	12,6 ± 2,4
Harnsäure (µmol/l)	112 ± 27	127 ± 30	140 ± 15	108 ± 31	121 ± 34	108 ± 31	121 ± 34	133 ± 25	108 ± 31	121 ± 34	133 ± 25	108 ± 31	121 ± 34	133 ± 25

Alter der Mäuse: 4 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; Hom: homozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus;

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a,b,c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's *t*-Test: ^ap<0,05, ^bp<0,001, ^cp<0,01; n.s.: nicht signifikant

1.3.2.3. Blutdaten von 7 Wochen alten mutanten Mäusen

Die klinisch-chemische Untersuchung des Blutes wurde bei 61 Tieren (männlich: 9 Wt, 15 Het, 9 Hom; weiblich: 8 Wt, 14 Het, 6 Hom) mit einem Lebensalter von 49 ± 1 Tagen durchgeführt (Tabelle 25).

Im Vergleich zu den Wildtypmäusen waren bei männlichen homozygoten Mutanten die Plasmakonzentrationen von Harnstoff, Natrium, Gesamtprotein sowie Cholesterol und die Aktivitäten von alkalischer Phosphatase und α -Amylase im Plasma signifikant erhöht. Signifikant erniedrigt war der Plasmaglukosewert. Bei männlichen heterozygoten Mutanten war die Plasmakonzentration von Gesamtprotein signifikant erhöht. Signifikant verringert waren die Plasmawerte von Phosphat (anorganisch) und Glukose. Bei weiblichen homozygoten Mutanten waren die Konzentrationen von Harnstoff, Gesamtprotein, Cholesterol sowie Triglyceriden im Plasma und die Plasmaaktivitäten von alkalischer Phosphatase wie α -Amylase signifikant und die Plasmakonzentrationen von Harnsäure ($p = 0,1$) sowie Transferrin ($p = 0,08$) moderat erhöht. Bei weiblichen heterozygoten Mutanten waren die Plasmawerte von Harnstoff, Gesamtprotein sowie Cholesterol signifikant und von Kalzium ($p = 0,05$) moderat erhöht und von Phosphat (anorganisch) signifikant erniedrigt. Im Vergleich zu den heterozygoten Mutanten waren bei männlichen homozygot mutanten Tieren die Plasmakonzentrationen von Harnstoff, Natrium und Phosphat (anorganisch) sowie die Plasmaaktivitäten von alkalischer Phosphatase signifikant und von α -Amylase ($p = 0,1$) moderat erhöht. Bei weiblichen homozygoten Mutanten waren die klinisch-chemischen Parameter Harnstoff, Phosphat (anorganisch), Cholesterol, alkalische Phosphatase sowie α -Amylase signifikant erhöht (Tabelle 25).

Tabelle 25: Blutplasmadaten von 7 Wochen alten Mäusen

	männlich						weiblich					
	Wt			Het			Wt			Het		
	n=7-9	n=11-15	n=7-9	n=11-15	n=7-9	n=11-15	n=6-8	n=14	n=6-8	n=14	n=6-8	n=14
Na ⁺ (mmol/l)	144 ± 2	145 ± 3	147 ± 2	145 ± 3	147 ± 2	144 ± 4	144 ± 3	144 ± 4	144 ± 3	147 ± 4	144 ± 3	144 ± 3
K ⁺ (mmol/l)	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,4	4,4 ± 0,3	4,4 ± 0,4	4,4 ± 0,3	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,4	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,4	4,3 ± 0,5	4,4 ± 0,4	4,3 ± 0,5
Ca ²⁺ (mmol/l)	2,3 ± 0,06	2,3 ± 0,07 ^a	2,3 ± 0,05	2,3 ± 0,07 ^a	2,3 ± 0,05	2,3 ± 0,09	2,4 ± 0,06	2,3 ± 0,09	2,4 ± 0,06	2,4 ± 0,07	2,4 ± 0,06	2,4 ± 0,07
Cl ⁻ (mmol/l)	101 ± 5	101 ± 5	103 ± 5	101 ± 5	103 ± 5	101 ± 6	100 ± 4	101 ± 6	100 ± 4	102 ± 5	100 ± 4	102 ± 5
Pi (mmol/l)	2,4 ± 0,4	2,0 ± 0,4	2,4 ± 0,3	2,0 ± 0,4	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,0 ± 0,3	2,4 ± 0,3	2,0 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,3	2,3 ± 0,2
Gesamtprotein (g/l)	50 ± 2	52 ± 2	52 ± 1	52 ± 2	52 ± 1	48 ± 2	51 ± 2	48 ± 2	51 ± 2	51 ± 1	51 ± 2	51 ± 1
Kreatinin (µmol/l)	8,1 ± 1,0	9,7 ± 2,6	9,6 ± 2,6	9,7 ± 2,6	9,6 ± 2,6	9,7 ± 2,3	8,9 ± 1,2	9,7 ± 2,3	8,9 ± 1,2	8,9 ± 2,0	8,9 ± 1,2	8,9 ± 2,0
Harnstoff (mmol/l)	9,2 ± 1,2 ^b	9,9 ± 1,6	17,8 ± 3,1	9,9 ± 1,6	17,8 ± 3,1	7,7 ± 0,6	10,7 ± 2,4	7,7 ± 0,6	10,7 ± 2,4	18,2 ± 2,1	10,7 ± 2,4	18,2 ± 2,1
Harnsäure (µmol/l)	127 ± 20	139 ± 33	129 ± 26	139 ± 33	129 ± 26	123 ± 23	141 ± 27	123 ± 23	141 ± 27	152 ± 36	141 ± 27	152 ± 36
Cholesterol (mmol/l)	3,4 ± 0,1 ^c	3,5 ± 0,3 ^c	3,7 ± 0,3	3,5 ± 0,3 ^c	3,7 ± 0,3	2,8 ± 0,2	3,1 ± 0,3	2,8 ± 0,2	3,1 ± 0,3	3,6 ± 0,5	3,1 ± 0,3	3,6 ± 0,5
Triglyceride (mmol/l)	1,4 ± 0,5	1,5 ± 0,6	1,9 ± 0,6	1,5 ± 0,6	1,9 ± 0,6	1,3 ± 0,4	1,7 ± 0,7	1,3 ± 0,4	1,7 ± 0,7	2,1 ± 0,5	1,7 ± 0,7	2,1 ± 0,5
AP (U/l)	194 ± 15 ^b	193 ± 15 ^c	215 ± 16 ^b	193 ± 15 ^c	215 ± 16 ^b	217 ± 10	216 ± 10	217 ± 10	216 ± 10	241 ± 8	216 ± 10	241 ± 8
α-Amylase (U/l)	554 ± 46 ^a	558 ± 84 ^a	614 ± 13 ^a	558 ± 84 ^a	614 ± 13 ^a	462 ± 74	491 ± 59	462 ± 74	491 ± 59	575 ± 38	491 ± 59	575 ± 38
Glukose (mmol/l)	9,8 ± 1,2 ^a	8,3 ± 1,7	7,2 ± 1,5	8,3 ± 1,7	7,2 ± 1,5	8,1 ± 1,9	8,0 ± 1,7	8,1 ± 1,9	8,0 ± 1,7	7,0 ± 1,2	8,0 ± 1,7	7,0 ± 1,2
Ferritin (µg/l)	18,5 ± 2,2	18,2 ± 3,2	20,8 ± 7,7	18,2 ± 3,2	20,8 ± 7,7	19,9 ± 3,3	18,7 ± 5,8	19,9 ± 3,3	18,7 ± 5,8	15,2 ± 7,7	18,7 ± 5,8	15,2 ± 7,7
Transferrin (µmol/l)	18,7 ± 3,8	18,4 ± 2,5	19,5 ± 0,5 ^a	18,4 ± 2,5	19,5 ± 0,5 ^a	17,1 ± 3,6	18,9 ± 2,4	17,1 ± 3,6	18,9 ± 2,4	20,4 ± 0,6	18,9 ± 2,4	20,4 ± 0,6

Alter der Mäuse: 7 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; Hom: homozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus; Pi: Phosphat (anorganisch); AP: alkalische Phosphatase; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's t-Test: ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001; n.s.: nicht signifikant

1.3.2.4. Blutdaten von 12–13 Wochen alten mutanten Mäusen

Die klinisch-chemische und hämatologische Untersuchung des Blutes wurde bei 46 Mäusen (männlich: 6 Wt, 10 Het, 10 Hom; weiblich: 7 Wt, 7 Het, 6 Hom) im Alter von 12–13 Wochen durchgeführt (Tabelle 26 & Tabelle 27).

Klinische Chemie des Blutes

Im Vergleich zu Wildtyptieren waren bei männlichen homozygot mutanten Tieren die Plasmakonzentrationen von Harnstoff sowie Albumin signifikant und von Cholesterol ($p = 0,05$) moderat erhöht sowie von Kalium signifikant und von Glukose ($p = 0,06$) wie Ferritin ($p = 0,05$) moderat erniedrigt. Bei männlichen heterozygoten Mutanten waren die Plasmawerte von Harnstoff und Cholesterol signifikant sowie von Albumin ($p = 0,06$) moderat erhöht und die Kalium- und Triglycerid-Plasmakonzentration signifikant erniedrigt. Bei weiblichen homozygoten Mutanten waren die Plasmakonzentrationen von Harnstoff, Kalzium, Gesamtprotein, Albumin, Cholesterol sowie Triglyceriden und die alkalische Phosphatase- wie α -Amylase-Aktivität und die Transferrin-Plasmakonzentration signifikant erhöht. Die Plasmawerte von Natrium ($p = 0,05$) sowie Lipase ($p = 0,08$) waren moderat erhöht und von Glukose signifikant erniedrigt. Bei weiblichen heterozygoten Mutanten waren die Konzentrationen von Harnstoff, Gesamtprotein, Cholesterol sowie Triglyceriden im Plasma signifikant und von Albumin ($p = 0,1$) sowie Transferrin ($p = 0,06$) moderat erhöht und von Glukose ($p = 0,06$) moderat erniedrigt. Im Vergleich zu den heterozygoten Mutanten hatten männliche und weibliche homozygote Mutanten einen signifikant erhöhten Plasmawert für Harnstoff (Tabelle 26).

Tabelle 26: Blutplasmadaten von 12–13 Wochen alten Mäusen

	männlich						weiblich					
	Student's <i>t</i> -Test			Student's <i>t</i> -Test			Student's <i>t</i> -Test			Student's <i>t</i> -Test		
	Wt	Het	Hom	Wt	Het	Hom	Wt	Het	Hom	Wt	Het	Hom
Na ⁺ (mmol/l)	n=5-6 MW ± SD	n=9-10 MW ± SD	n=10 MW ± SD	n=6-7 MW ± SD	n=7 MW ± SD	n=6 MW ± SD	n=6-7 MW ± SD	n=7 MW ± SD	n=6 MW ± SD	n=7 MW ± SD	n=6 MW ± SD	n=6 MW ± SD
K ⁺ (mmol/l)	148 ± 6	150 ± 6	149 ± 6	149 ± 4	149 ± 7	152 ± 2	149 ± 4	149 ± 7	152 ± 2	149 ± 7	152 ± 2	152 ± 2
Ca ²⁺ (mmol/l)	4,8 ± 0,2	4,4 ± 0,3	4,3 ± 0,3	4,6 ± 0,3	4,5 ± 0,5	4,4 ± 0,3	4,6 ± 0,3	4,5 ± 0,5	4,4 ± 0,3	4,5 ± 0,5	4,4 ± 0,3	4,4 ± 0,3
Cl ⁻ (mmol/l)	2,2 ± 0,11	2,2 ± 0,07	2,2 ± 0,11 ^a	2,2 ± 0,06	2,3 ± 0,11	2,4 ± 0,07	2,2 ± 0,06	2,3 ± 0,11	2,4 ± 0,07	2,3 ± 0,11	2,4 ± 0,07	2,4 ± 0,07
Pi (mmol/l)	109 ± 3	109 ± 4	108 ± 5	111 ± 4	108 ± 5	110 ± 2	111 ± 4	108 ± 5	110 ± 2	108 ± 5	110 ± 2	110 ± 2
Gesamtprotein (g/l)	2,0 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,4	2,0 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,8 ± 0,3	2,0 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,8 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,8 ± 0,3	1,8 ± 0,3
Albumin (g/l)	55 ± 3	56 ± 2	57 ± 3	54 ± 2	57 ± 3	59 ± 2	54 ± 2	57 ± 3	59 ± 2	57 ± 3	59 ± 2	59 ± 2
Kreatinin (μmol/l)	23,3 ± 2,4	25,4 ± 1,6	26,6 ± 1,9 ^a	25,4 ± 1,5	27,4 ± 2,5	29,0 ± 1,1	25,4 ± 1,5	27,4 ± 2,5	29,0 ± 1,1	27,4 ± 2,5	29,0 ± 1,1	29,0 ± 1,1
Harnstoff (mmol/l)	8,4 ± 1,3	8,4 ± 1,5	8,2 ± 2,8	8,3 ± 0,6	8,8 ± 1,3	9,0 ± 1,9	8,3 ± 0,6	8,8 ± 1,3	9,0 ± 1,9	8,8 ± 1,3	9,0 ± 1,9	9,0 ± 1,9
Harnsäure (μmol/l)	10,0 ± 1,2 ^b	13,2 ± 3,2	20,1 ± 3,9	7,7 ± 1,1	15,0 ± 2,3	19,5 ± 1,8	7,7 ± 1,1	15,0 ± 2,3	19,5 ± 1,8	15,0 ± 2,3	19,5 ± 1,8	19,5 ± 1,8
Cholesteroll (mmol/l)	182 ± 31	209 ± 49	218 ± 61	198 ± 29	209 ± 63	227 ± 50	198 ± 29	209 ± 63	227 ± 50	209 ± 63	227 ± 50	227 ± 50
Triglyceride (mmol/l)	3,6 ± 0,2 ^c	3,8 ± 0,1 ^a	4,1 ± 0,5	3,0 ± 0,2	3,5 ± 0,4	4,0 ± 0,6	3,0 ± 0,2	3,5 ± 0,4	4,0 ± 0,6	3,5 ± 0,4	4,0 ± 0,6	4,0 ± 0,6
ALT (U/l)	2,5 ± 0,5 ^b	1,5 ± 0,4	2,0 ± 0,9	1,2 ± 0,7	1,9 ± 0,5	2,3 ± 0,7	1,2 ± 0,7	1,9 ± 0,5	2,3 ± 0,7	1,9 ± 0,5	2,3 ± 0,7	2,3 ± 0,7
AST (U/l)	49 ± 14 ^a	40 ± 17	39 ± 14	33 ± 8	39 ± 20	33 ± 6	33 ± 8	39 ± 20	33 ± 6	39 ± 20	33 ± 6	33 ± 6
AP (U/l)	74 ± 52	48 ± 14	51 ± 16	61 ± 18	55 ± 11	55 ± 13	61 ± 18	55 ± 11	55 ± 13	55 ± 11	55 ± 13	55 ± 13
Lipase (U/l)	121 ± 8 ^a	120 ± 11 ^b	134 ± 25 ^a	140 ± 17	147 ± 19	167 ± 16	140 ± 17	147 ± 19	167 ± 16	147 ± 19	167 ± 16	167 ± 16
α-Amylase (U/l)	50 ± 5	53 ± 6	54 ± 5	53 ± 6	56 ± 5	61 ± 11	53 ± 6	56 ± 5	61 ± 11	56 ± 5	61 ± 11	61 ± 11
Glukose (mmol/l)	565 ± 34 ^a	548 ± 40	571 ± 44	509 ± 39	544 ± 58	585 ± 39	509 ± 39	544 ± 58	585 ± 39	544 ± 58	585 ± 39	585 ± 39
Ferritin (μg/l)	8,5 ± 0,9	7,6 ± 1,7	6,7 ± 2,1	8,6 ± 1,0	7,1 ± 1,7	6,4 ± 1,2	8,6 ± 1,0	7,1 ± 1,7	6,4 ± 1,2	7,1 ± 1,7	6,4 ± 1,2	6,4 ± 1,2
Transferrin (μmol/l)	24,7 ± 1,3	22,0 ± 5,3	20,8 ± 4,3	26,7 ± 5,3	23,2 ± 5,2	22,9 ± 7,5	26,7 ± 5,3	23,2 ± 5,2	22,9 ± 7,5	23,2 ± 5,2	22,9 ± 7,5	22,9 ± 7,5
Eisen (μmol/l)	19,6 ± 0,6	20,0 ± 0,7	20,0 ± 0,6 ^b	19,7 ± 0,8	20,5 ± 0,8	21,1 ± 0,4	19,7 ± 0,8	20,5 ± 0,8	21,1 ± 0,4	20,5 ± 0,8	21,1 ± 0,4	21,1 ± 0,4
Alter der Mäuse: 12–13 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; Hom: homozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus; Pi: Phosphat (anorganisch); ALT: Alanin-Aminotransferase; AST: Aspartat-Aminotransferase; AP: alkalische Phosphatase; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a,b,c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's <i>t</i> -Test: ^a p<0,05, ^b p<0,01, ^c p<0,001; n.s.: nicht signifikant	33,2 ± 5,1	36,3 ± 5,2	36,5 ± 7,9	36,8 ± 6,3	40,1 ± 9,7	42,9 ± 6,6	36,8 ± 6,3	40,1 ± 9,7	42,9 ± 6,6	40,1 ± 9,7	42,9 ± 6,6	42,9 ± 6,6

Alter der Mäuse: 12–13 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; Hom: homozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus; Pi: Phosphat (anorganisch); ALT: Alanin-Aminotransferase; AST: Aspartat-Aminotransferase; AP: alkalische Phosphatase; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a,b,c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's *t*-Test: ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001; n.s.: nicht signifikant

Blutbild

Bei der Analyse des Blutbildes zeigte sich für die meisten der untersuchten Blutbildparameter kein signifikanter Unterschied zwischen Mutanten und Wildtyptieren. Signifikant erniedrigt war bei männlichen homozygot mutanten Tieren RBC und bei männlichen heterozygoten Mutanten RBC und HKT. Bei weiblichen homozygoten Mutanten waren MCV und MCH signifikant erniedrigt (Tabelle 27).

Tabelle 27: Hämatologiedaten von 12–13 Wochen alten Mäusen

	männlich										weiblich									
	Student's <i>t</i> -Test					Student's <i>t</i> -Test					Student's <i>t</i> -Test			Student's <i>t</i> -Test						
	Wt	Het	Hom	vs.	Hom	Wt	Het	Hom	vs.	Hom	Wt	Het	Hom	vs.	Hom	Wt	Het	Hom	vs.	Hom
RBC (10e12/l)	8,6 ± 0,4	8,1 ± 0,3 ^b	8,2 ± 0,2	p<0,01	p<0,01	8,4 ± 0,3	8,5 ± 0,2	8,5 ± 0,4	n.s.	n.s.	8,5 ± 0,2	8,5 ± 0,2	8,5 ± 0,4	n.s.	n.s.	8,5 ± 0,2	8,5 ± 0,2	8,5 ± 0,4	n.s.	n.s.
MCV (fl)	51,0 ± 0,7 ^a	51,7 ± 1,4	51,4 ± 1,4	n.s.	n.s.	52,0 ± 0,6	51,6 ± 1,6	50,8 ± 0,4	n.s.	n.s.	51,6 ± 1,6	51,6 ± 1,6	50,8 ± 0,4	p<0,01	p<0,01	51,6 ± 1,6	51,6 ± 1,6	50,8 ± 0,4	n.s.	n.s.
MCH (fmol)	1,11 ± 0,05	1,13 ± 0,04	1,13 ± 0,06	n.s.	n.s.	1,16 ± 0,03	1,14 ± 0,06	1,12 ± 0,03	n.s.	n.s.	1,14 ± 0,06	1,14 ± 0,06	1,12 ± 0,03	p<0,05	p<0,05	1,14 ± 0,06	1,14 ± 0,06	1,12 ± 0,03	n.s.	n.s.
MCHC (mmol/l)	21,8 ± 0,7	21,9 ± 0,5	22,0 ± 0,6	n.s.	n.s.	22,2 ± 0,6	22,1 ± 0,7	22,0 ± 0,4	n.s.	n.s.	22,1 ± 0,7	22,1 ± 0,7	22,0 ± 0,4	n.s.	n.s.	22,1 ± 0,7	22,1 ± 0,7	22,0 ± 0,4	n.s.	n.s.
RDW (% von MCV)	12,2 ± 0,4	12,4 ± 0,7	12,4 ± 0,8	n.s.	n.s.	12,2 ± 0,2	12,5 ± 1,1	12,0 ± 0,3	n.s.	n.s.	12,5 ± 1,1	12,5 ± 1,1	12,0 ± 0,3	n.s.	n.s.	12,5 ± 1,1	12,5 ± 1,1	12,0 ± 0,3	n.s.	n.s.
HB (mmol/l)	9,6 ± 0,4	9,2 ± 0,4 ^a	9,3 ± 0,6	n.s.	n.s.	9,8 ± 0,3	9,7 ± 0,6	9,5 ± 0,5	n.s.	n.s.	9,7 ± 0,6	9,7 ± 0,6	9,5 ± 0,5	n.s.	n.s.	9,7 ± 0,6	9,7 ± 0,6	9,5 ± 0,5	n.s.	n.s.
HKT (l/l)	0,44 ± 0,02	0,42 ± 0,01 ^a	0,42 ± 0,02	p=0,060	p=0,060	0,44 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,43 ± 0,02	n.s.	n.s.	0,44 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,43 ± 0,02	n.s.	n.s.	0,44 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,43 ± 0,02	n.s.	n.s.
WBC (10e9/l)	4,2 ± 1,7	4,3 ± 1,2	4,5 ± 0,9	n.s.	n.s.	4,4 ± 1,1	3,8 ± 1,2	4,2 ± 0,9	n.s.	n.s.	3,8 ± 1,2	3,8 ± 1,2	4,2 ± 0,9	n.s.	n.s.	3,8 ± 1,2	3,8 ± 1,2	4,2 ± 0,9	n.s.	n.s.
PLT (10e9/l)	466 ± 57	467 ± 44	469 ± 28	n.s.	n.s.	503 ± 39	480 ± 62	474 ± 28	n.s.	n.s.	480 ± 62	480 ± 62	474 ± 28	n.s.	n.s.	480 ± 62	480 ± 62	474 ± 28	n.s.	n.s.
MPV (fl)	6,5 ± 0,2	6,2 ± 0,5	6,3 ± 0,3	p=0,077	p=0,077	6,5 ± 0,4	6,5 ± 0,4	6,3 ± 0,3	n.s.	n.s.	6,5 ± 0,4	6,5 ± 0,4	6,3 ± 0,3	n.s.	n.s.	6,5 ± 0,4	6,5 ± 0,4	6,3 ± 0,3	n.s.	n.s.

Alter der Mäuse: 12–13 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; Hom: homozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus; RBC: Erythrozytenzahl; MCV: mittleres Erythrozytenvolumen; MCH: mittlerer Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten; MCHC: mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten; RDW: Erythrozytenverteilungsbreite; HB: Hämoglobin; HKT: Hämokrit; WBC: Leukozytenzahl; PLT: Thrombozyten; MPV: mittlere Thrombozytengröße; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's *t*-Test: ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001; n.s.: nicht signifikant

1.3.2.5. Blutdaten von 35–37 Wochen alten mutanten Mäusen

Die klinisch-chemische und hämatologische Untersuchung des Blutes wurde bei 39 Mäusen (männlich: 9 Wt, 10 Het; weiblich: 9 Wt, 11 Het) im Alter von 35–36 Wochen durchgeführt (Tabelle 28 & Tabelle 30). Bei 40 gefasteten Tieren (10 pro Genotyp und Geschlecht) im Alter von 36–37 Wochen wurden die Parameter Cholesterol, HDL-Cholesterol, nicht-HDL-Cholesterol, Triglyceride, NEFA und Glukose gemessen (Tabelle 29).

Klinische Chemie des Blutes

Im Vergleich zu den Wildtypkontrollen waren bei männlichen heterozygot mutanten Tieren die Plasmakonzentrationen von Harnstoff, Kreatinin, Kalium sowie Kalzium und die Plasmaaktivität von alkalischer Phosphatase signifikant erhöht. Dagegen waren die Parameter Cholesterol, nicht-HDL-Cholesterol (mit Futterentzug), Triglyceride (ohne und mit Futterentzug), Glukose (mit Futterentzug), Ferritin sowie Transferrin signifikant und Phosphat (anorganisch) ($p = 0,09$), Glukose ($p = 0,1$) sowie Eisen ($p = 0,09$) moderat erniedrigt. Bei weiblichen heterozygoten Mutanten waren die Konzentrationen von Harnstoff, Kreatinin, Natrium, Kalium und Kalzium im Plasma sowie die Aktivitäten von alkalischer Phosphatase und α -Amylase im Plasma signifikant erhöht. Die Plasmakonzentrationen von Phosphat (anorganisch), Cholesterol, nicht-HDL-Cholesterol (mit Futterentzug), Triglyceriden (ohne und mit Futterentzug), Glukose (mit Futterentzug), Ferritin, Transferrin und Eisen waren dagegen signifikant erniedrigt (Tabelle 28 & Tabelle 29).

Tabelle 28: Blutplasmadaten von 35–36 Wochen alten Mäusen

	männlich			weiblich		
	Wt		Het	Wt		Het
	n=9	n=10	vs.	n=9	n=11	vs.
	MW ± SD	MW ± SD	Student's t-Test	MW ± SD	MW ± SD	Student's t-Test
Na ⁺ (mmol/l)	151 ± 4 ^a	152 ± 2 ^c	n.s.	148 ± 2	150 ± 1	p<0,05
K ⁺ (mmol/l)	4,7 ± 0,4 ^c	5,2 ± 0,3 ^c	p<0,01	4,0 ± 0,2	4,7 ± 0,2	p<0,001
Ca ²⁺ (mmol/l)	2,2 ± 0,06	2,3 ± 0,04	p<0,05	2,2 ± 0,05	2,3 ± 0,06	p<0,01
Cl ⁻ (mmol/l)	117 ± 3 ^a	116 ± 2 ^b	n.s.	114 ± 3	113 ± 2	n.s.
Pi (mmol/l)	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,5 ^a	p=0,085	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,2	p<0,001
Gesamtprotein (g/l)	54 ± 1	54 ± 1 ^a	n.s.	53 ± 2	52 ± 2	n.s.
Albumin (g/l)	28,7 ± 1,0	28,8 ± 1,0 ^a	n.s.	29,3 ± 1,7	29,8 ± 0,6	n.s.
Kreatinin (µmol/l)	9,1 ± 1,3	10,3 ± 0,9 ^c	p<0,05	10,2 ± 1,1	12,5 ± 1,2	p<0,001
Harnstoff (mmol/l)	9,6 ± 1,0	21,2 ± 2,1 ^a	p<0,001	9,5 ± 0,9	18,9 ± 2,4	p<0,001
Cholesterol (mmol/l)	4,9 ± 0,3 ^c	4,2 ± 0,3 ^c	p<0,001	3,5 ± 0,3	3,1 ± 0,2	p<0,01
Triglyceride (mmol/l)	4,6 ± 1,0	3,5 ± 0,8	p<0,05	4,7 ± 0,7	3,2 ± 0,6	p<0,001
ALT (U/l)	34 ± 13	28 ± 9	n.s.	27 ± 2	24 ± 6	n.s.
AST (U/l)	48 ± 25	42 ± 7	n.s.	42 ± 4	47 ± 9	n.s.
AP (U/l)	81 ± 6 ^c	106 ± 11 ^c	p<0,001	132 ± 18	169 ± 17	p<0,001
α-Amylase (U/l)	633 ± 29 ^b	658 ± 40 ^a	n.s.	577 ± 32	616 ± 48	p<0,05
LDH (U/l)	143 ± 53	123 ± 31	n.s.	146 ± 26	144 ± 33	n.s.
Laktat (mmol/l)	10,5 ± 1,2	10,0 ± 2,1	n.s.	9,6 ± 1,1	9,6 ± 1,8	n.s.
Glukose (mmol/l)	8,3 ± 0,7	7,6 ± 0,9	p=0,099	8,2 ± 0,7	8,0 ± 1,4	n.s.
Ferritin (µg/l)	33,6 ± 18,2	20,0 ± 6,2 ^b	p<0,05	41,0 ± 6,2	30,7 ± 7,8	p<0,01
Transferrin (µmol/l)	20,1 ± 0,5	18,8 ± 0,6	p<0,001	19,8 ± 0,7	18,9 ± 0,6	p<0,01
Eisen (µmol/l)	31,4 ± 4,1	28,0 ± 4,2	p=0,091	33,8 ± 4,0	29,1 ± 3,2	p<0,01

Alter der Mäuse: 35–36 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus; Pi: Phosphat (anorganisch); ALT: Alanin-Aminotransferase; AST: Aspartat-Aminotransferase; AP: alkalische Phosphatase; LDH: Laktatdehydrogenase; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's t-Test: ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001; n.s.: nicht signifikant

Blutbild

Im Vergleich zu den Wildtypmäusen waren bei den heterozygoten Mutanten beider Geschlechter die Hämatologieparameter RBC, MCV, MCH, RDW, HB und HKT signifikant verringert (Tabelle 30).

Tabelle 30: Hämatologiedaten von 35–36 Wochen alten Mäusen

	männlich			weiblich			Student's <i>t</i> -Test
	Wt		Het	Wt		Het	
	MW ± SD	n	MW ± SD	p	MW ± SD	n	
RBC (10e12/l)	9,1 ± 0,3	n=9	8,6 ± 0,2 ^c	p<0,001	9,3 ± 0,3	n=9	p<0,05
MCV (fl)	54,3 ± 0,7	n=9	52,3 ± 0,5 ^b	p<0,001	54,9 ± 0,6	n=11	p<0,001
MCH (fmol)	0,98 ± 0,01	n=9	0,95 ± 0,02	p<0,001	0,99 ± 0,03	n=11	p<0,001
MCHC (mmol/l)	18,0 ± 0,2	n=9	18,1 ± 0,3	n.s.	18,0 ± 0,3	n=11	n.s.
RDW (% von MCV)	12,8 ± 0,2 ^a	n=9	12,5 ± 0,2 ^a	p<0,05	12,6 ± 0,2	n=11	p<0,01
HB (mmol/l)	8,9 ± 0,3 ^a	n=9	8,1 ± 0,2 ^c	p<0,001	9,2 ± 0,4	n=11	p<0,001
HKT (l/l)	0,50 ± 0,02 ^a	n=9	0,45 ± 0,01 ^c	p<0,001	0,51 ± 0,02	n=11	p<0,001
WBC (10e9/l)	6,6 ± 0,7	n=9	6,7 ± 1,6	n.s.	7,2 ± 1,4	n=11	n.s.
PLT (10e9/l)	1197 ± 139	n=9	1163 ± 178	n.s.	1089 ± 137	n=11	n.s.
MPV (fl)	5,7 ± 0,3	n=9	5,5 ± 0,1	n.s.	6,0 ± 0,5	n=11	n.s.

Alter der Mäuse: 35–36 Wochen; Wt: Wildtypmäuse; Het: heterozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus; RBC: Erythrozytenzahl; MCV: mittleres Erythrozytenvolumen; MCH: mittlerer Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten; MCHC: mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten; RDW: Erythrozytenverteilungsbreite; HB: Hämoglobin; HKT: Hämatokrit; WBC: Leukozytenzahl; PLT: Thrombozytenzahl; MPV: mittlere Thrombozytengröße; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen; Student's *t*-Test: ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001; n.s.: nicht signifikant

1.3.2.6. Blutdaten von 84–99 Wochen alten mutanten Mäusen

Die klinisch-chemische Untersuchung des Blutes wurde bei 30 Tieren (männlich: 8 Wt, 10 Het; weiblich: 7 Wt, 5 Het) im Alter von 20–23 Monaten durchgeführt (Tabelle 31).

Im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren waren bei männlichen heterozygot mutanten Tieren folgende klinisch-chemischen Parameter signifikant erhöht: Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, Lipase und α -Amylase. Signifikant erniedrigt war die Plasmaaktivität von ALT. Bei weiblichen heterozygot mutanten Mäusen waren die Parameter Harnstoff, Natrium, α -Amylase sowie Glukose signifikant erhöht. Moderat erniedrigt waren Triglycerid-Plasmakonzentrationen ($p = 0,05$) und die Plasmaaktivität von ALT ($p = 0,06$) (Tabelle 31).

Tabelle 31: Blutplasmadaten von 84–99 Wochen alten Mäusen

	männlich				weiblich			
	Wt		Het		Wt		Het	
	MW \pm SD	n	MW \pm SD	n	MW \pm SD	n	MW \pm SD	n
Na ⁺ (mmol/l)	151 \pm 3	8	155 \pm 5	10	150 \pm 1	7	154 \pm 3	5
K ⁺ (mmol/l)	4,5 \pm 0,6		4,6 \pm 0,9		4,1 \pm 0,3		4,1 \pm 0,5	
Ca ²⁺ (mmol/l)	2,3 \pm 0,14		2,1 \pm 0,76		2,3 \pm 0,09		2,4 \pm 0,13	
Cl ⁻ (mmol/l)	112 \pm 4		111 \pm 4		113 \pm 2		113 \pm 3	
Pi (mmol/l)	2,1 \pm 0,3		2,4 \pm 0,4		1,9 \pm 0,3		2,0 \pm 0,2	
Gesamtprotein (g/l)	61 \pm 9		59 \pm 5		55 \pm 3		55 \pm 3	
Albumin (g/l)	29,5 \pm 5,0		28,2 \pm 2,1		28,0 \pm 1,8		28,8 \pm 1,8	
Kreatinin (μ mol/l)	10,2 \pm 1,6		12,9 \pm 2,3		11,9 \pm 2,3		13,4 \pm 1,8	
Harnstoff (mmol/l)	8,7 \pm 0,8		25,8 \pm 4,5 ^b		8,7 \pm 1,3		18,2 \pm 1,4	
Harnsäure (μ mol/l)	58 \pm 15		140 \pm 90		86 \pm 45		100 \pm 47	
Cholesterol (mmol/l)	5,4 \pm 1,3 ^b		4,7 \pm 0,7 ^b		3,5 \pm 0,5		3,6 \pm 0,3	
Triglyceride (mmol/l)	1,3 \pm 0,9		1,3 \pm 0,8		1,3 \pm 0,5		0,8 \pm 0,4	
ALT (U/l)	67 \pm 35		40 \pm 12		47 \pm 18		28 \pm 10	
AST (U/l)	61 \pm 15		61 \pm 18		64 \pm 26		62 \pm 19	
AP (U/l)	95 \pm 24 ^b		104 \pm 9 ^c		206 \pm 78		280 \pm 86	
Lipase (U/l)	37 \pm 4		57 \pm 6		42 \pm 7		53 \pm 16	
α -Amylase (U/l)	663 \pm 138		810 \pm 56		586 \pm 55		735 \pm 83	
Glukose (mmol/l)	8,2 \pm 2,0 ^a		7,1 \pm 3,3		6,2 \pm 1,4		8,6 \pm 1,5	
Ferritin (μ g/l)	34,1 \pm 8,3		28,0 \pm 6,8 ^a		44,5 \pm 13,7		51,5 \pm 22,1	
Transferrin (μ mol/l)	25,5 \pm 6,4		22,0 \pm 1,5		21,7 \pm 0,5		21,7 \pm 0,3	
Eisen (μ mol/l)	33,0 \pm 3,9		33,3 \pm 3,1 ^c		29,7 \pm 4,1		26,0 \pm 2,7	

Alter der Mäuse: 84–99 Wochen; Wt: Wildtyptiere; Het: heterozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus; Pi: Phosphat (anorganisch); ALT: Alanin-Aminotransferase; AST: Aspartat-Aminotransferase; AP: alkalische Phosphatase; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's *t*-Test: ^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,001$; n.s.: nicht signifikant

1.3.2.7. Verlauf ausgewählter Blutparameter

Da homozygot mutante Tiere erst nach der Identifikation der ursächlichen Mutation erstellt wurden, standen für diese Arbeit Tiere dieses Genotyps nur für die Messzeitpunkte zwei Wochen p.p. bis 12–13 Wochen p.p. zur Verfügung. Danach wurden nur heterozygot mutante Mäuse und Kontrolltiere untersucht.

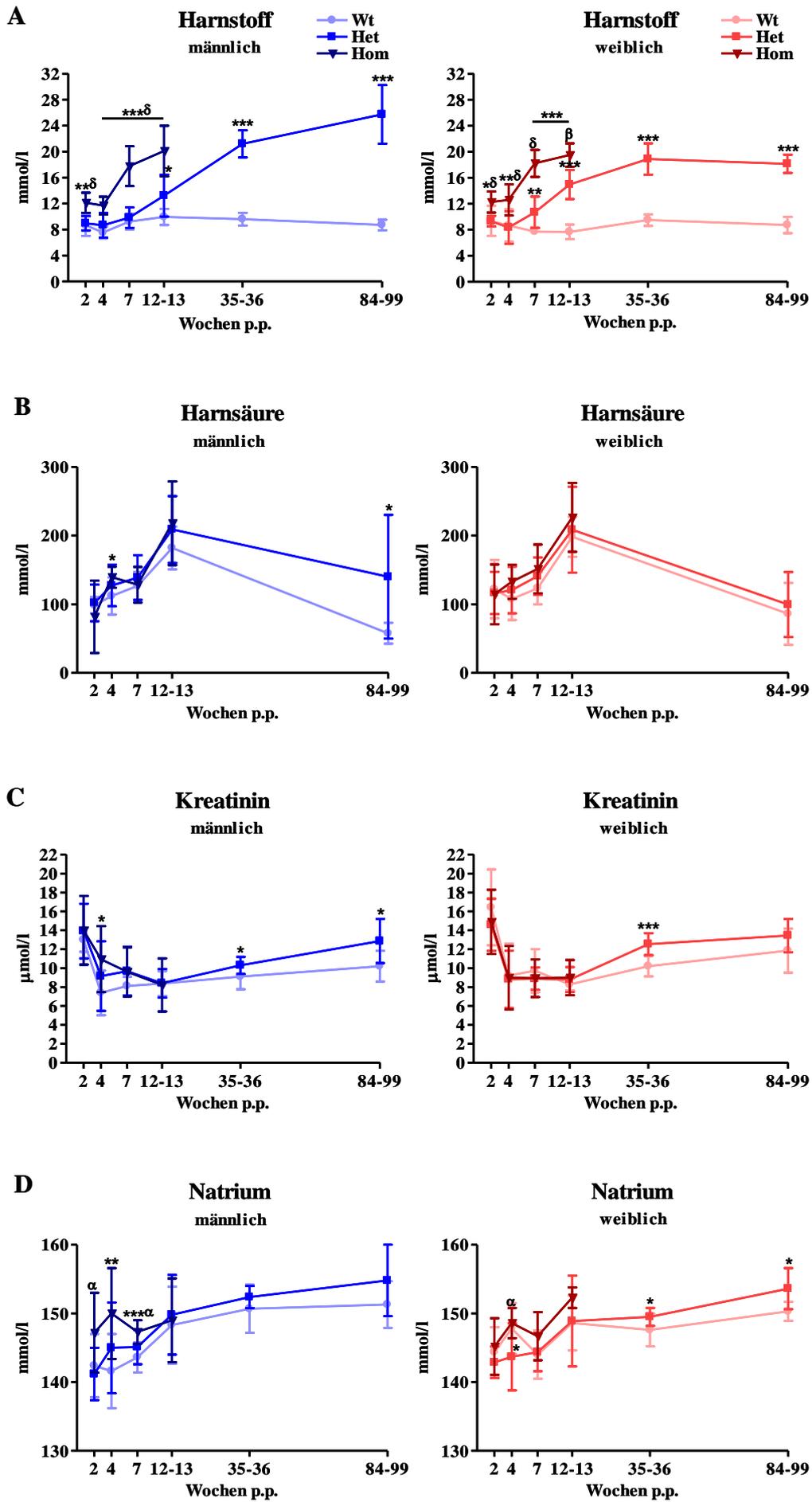
Im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren zeigten die homozygoten Mutanten bereits ab einem Lebensalter von zwei Wochen signifikant erhöhte Plasmaharnstoffwerte (männlich: $p < 0,01$; weiblich: $p < 0,05$), die ab der vierten Woche p.p. stark anstiegen. Die Werte sieben Wochen p.p. und drei Monate p.p. waren ca. doppelt so hoch wie die der Kontrolltiere. Bei den heterozygoten Mutanten beider Geschlechter war ein Anstieg des Harnstoffwerts im Plasma sieben Wochen p.p. festzustellen. Die Werte waren bei den weiblichen Tieren ab sieben Wochen p.p. und bei den männlichen Tieren ab einem Lebensalter von zwölf Wochen signifikant gegenüber den Wildtyptieren erhöht. Während der Harnstoffwert bei den männlichen heterozygoten Tieren mit 84–99 Wochen nochmals anstieg, war dies bei den weiblichen Tieren nicht der Fall. Gegenüber den heterozygoten Mutanten zeigten die homozygoten Mutanten beider Geschlechter zu den Messzeitpunkten ab zwei Wochen p.p. bis zum Lebensalter von drei Monaten einen signifikant erhöhten Plasmaharnstoffwert. 12–13 Wochen alte homozygot mutante Tiere wiesen durchschnittliche Harnstoffwerte im Plasma in einem Konzentrationsbereich auf, der bei gleichgeschlechtlichen heterozygoten Mutanten erst mit einem Alter von 35–36 Wochen nachgewiesen wurde (Abbildung 10A).

Die Plasmaharnsäurewerte bei den weiblichen Mäusen aller drei Genotypgruppen stiegen von zwei bis zwölf Lebenswochen an. Der Messzeitpunkt mit 84–99 Wochen ergab fast wieder die niedrigen Ausgangswerte. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypgruppen war nicht festzustellen. Die männlichen Mäuse zeigten ähnliche Plasmaharnsäurekonzentrationen wie die weiblichen Tiere, wobei die Messung mit 84–99 Wochen p.p. große individuelle Unterschiede bei den heterozygoten Mutanten erbrachte (Abbildung 10B).

Die Plasmakreatininkonzentration (enzymatisch bestimmt) sank bei den Tieren beider Geschlechter aller drei Genotypen von ca. $15 \mu\text{mol/l}$ zwei Wochen p.p. auf unter $10 \mu\text{mol/l}$ zwölf Wochen p.p.. Dabei zeigten sich keine Genotypunterschiede. Zu den Messzeitpunkten 35–36 Wochen p.p. und 84–99 Wochen p.p. stiegen die Plasmakreatininwerte wieder an, wobei die heterozygoten Mutanten höhere Werte als die Wildtyptiere zeigten (Abbildung 10C).

Natrium zeigte für die Messzeitpunkte ab sieben Wochen p.p. erhöhte Werte bei den mutanten Tieren, die teils signifikant waren (Abbildung 10D). Kalium wies für die mutanten Tiere gegenüber den Wildtypkontrollen keinen einheitlichen Verlauf auf (Abbildung 10E). Die Plasmawerte von Chlorid waren zwischen den Genotypgruppen unverändert (Abbildung 10F).

Gesamtprotein war bei den mutanten Tieren für die Messzeitpunkte vier Wochen p.p. bis 12–13 Wochen p.p. oft erhöht. An den letzten beiden Messzeitpunkten wurde kein Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypgruppen festgestellt (Abbildung 10G).



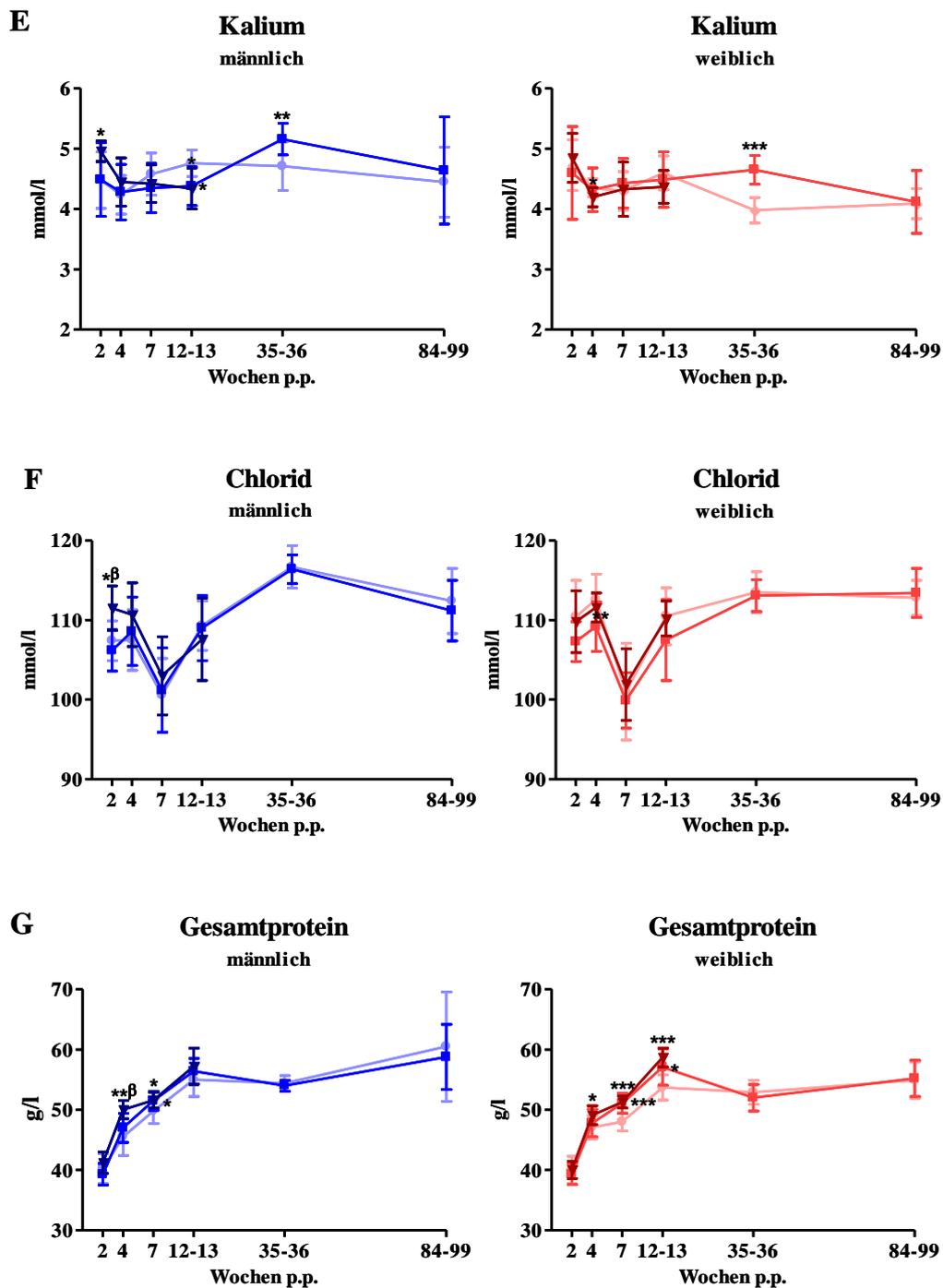


Abbildung 10: Verlauf ausgewählter Blutparameter

(A–G) Messzeitpunkte ab einem Lebensalter von 2 Wochen bis 12–13 Wochen p.p. bei homozygot mutanten Mäusen und bis 84–99 Wochen p.p. bei heterozygot mutanten Mäusen und Wildtypieren. Mittelwerte \pm Standardabweichungen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; Hom: homozygote Mutanten; p.p.: post partum; *, **, *** Mutanten verglichen mit Wildtypieren, α , β , δ heterozygote Mutanten verglichen mit homozygoten Mutanten, Student's *t*-Test: * α $p < 0,05$, ** β $p < 0,01$, *** δ $p < 0,001$

1.3.3. Weitere Ergebnisse aus der Untersuchung in der „GMC“

1.3.3.1. Funktionelle Nierenparameter

Die funktionellen Nierenparameter wurden bei 34 Mäusen im Alter von 39–42 Wochen (männlich: 7 Wt, 9 Het; weiblich: 8 Wt, 10 Het) im Stoffwechsellkäfig untersucht (Tabelle 32 & Tabelle 33).

Heterozygote Mutanten beider Geschlechter zeigten nur 65–70 % des Körpergewichts von Wildtyptieren, aber eine stark erhöhte Wasseraufnahme und einen 2–2,5fachen Anstieg des täglichen Harnvolumens mit 40–50 %iger Verringerung der Harnosmolalität (Abbildung 11A). Im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren war bei männlichen heterozygoten Mutanten die tägliche Harnausscheidung der Parameter Harnstoff, Natrium, Kalium, Kalzium (4,7fach) (Abbildung 11B), Chlorid und Magnesium signifikant erhöht, und von Harnsäure, Phosphat (anorganisch) und Albumin signifikant erniedrigt. Bei weiblichen heterozygoten Mutanten wurde eine signifikante Erhöhung der Kalziumexkretion (2,6fach) (Abbildung 11B) sowie eine moderate Erhöhung der Kalium- ($p = 0,07$) und Magnesiumausscheidung ($p = 0,09$) im Vergleich zu den Wildtypmäusen nachgewiesen. Mit dem Urin signifikant verringert ausgeschieden wurden Harnsäure, Phosphat (anorganisch), Gesamtprotein und Albumin (Tabelle 32). Während bei heterozygoten Mutanten beider Geschlechter das Urin/Plasma-Verhältnis (U/P) von Kalzium erhöht war (männlich: 2,1fach – signifikant; weiblich: 1,2fach – $p = 0,27$), waren die Urin/Plasma-Verhältnisse von Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin, Natrium, Kalium, Chlorid, Magnesium und Phosphat verringert (Abbildung 11C). Des Weiteren war bei heterozygoten Mutanten die fraktionelle Exkretion (FE) der Parameter Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid und Magnesium signifikant erhöht und die FE von Harnstoff, Harnsäure und Phosphat (anorganisch) erniedrigt (Abbildung 11D) (Tabelle 33).

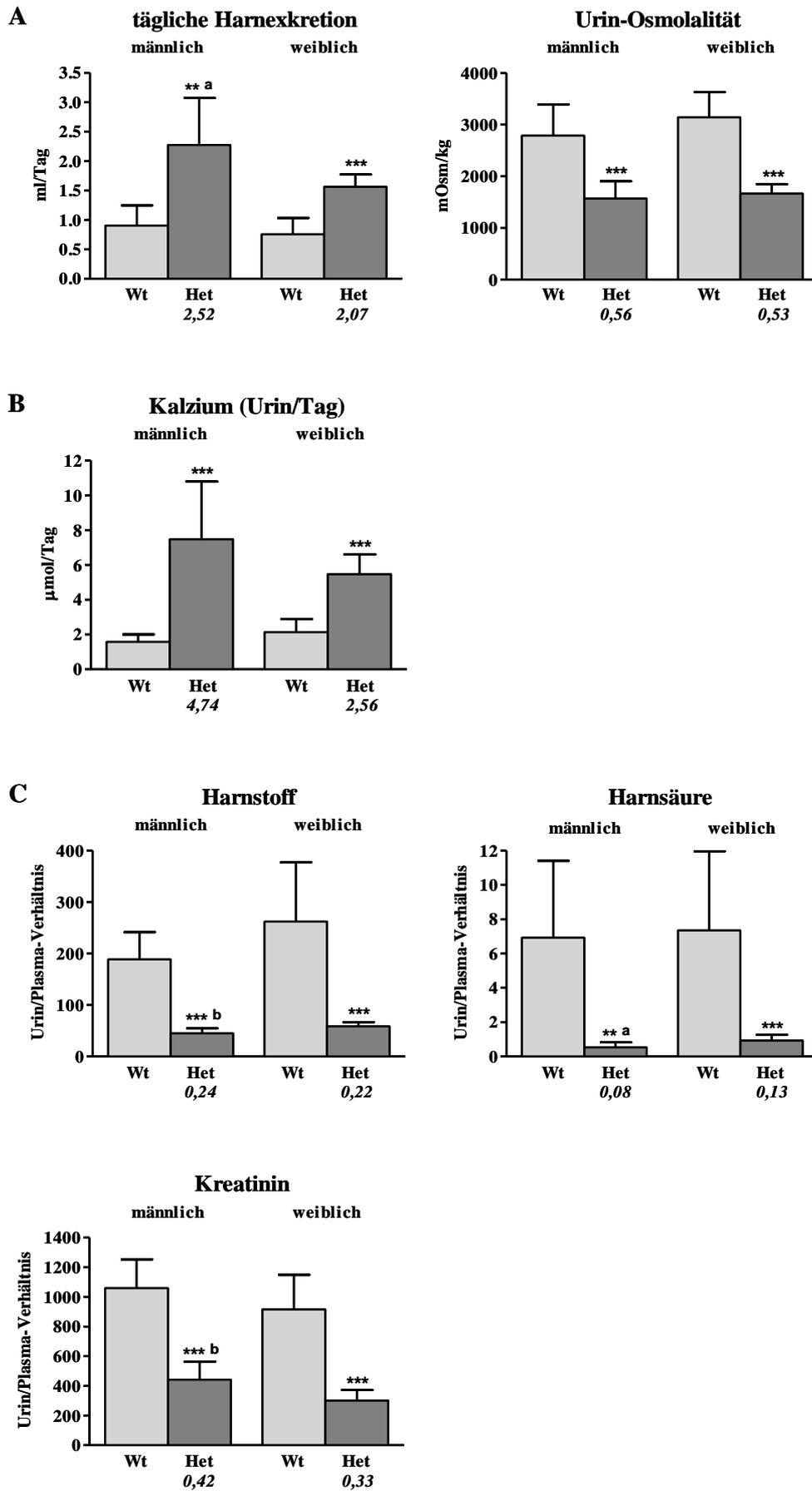
Tabelle 33: Kreatinin-Clearance, U/P-Verhältnis und FE von 39–42 Wochen alten Mäusen

	männlich				weiblich			
	Wt		Het		Wt		Het	
	MW ± SD	n	MW ± SD	n	MW ± SD	n	MW ± SD	n
Kreatinin-Clearance	938 ± 351	n=7	947 ± 337 ^c	n=8	677 ± 277	n=8	461 ± 82	n=10
Urin/Plasma Na ⁺	1,07 ± 0,35		0,70 ± 0,14		1,14 ± 0,25		0,74 ± 0,20	
Urin/Plasma K ⁺	80 ± 18 ^a		50 ± 10		99 ± 15		55 ± 7	
Urin/Plasma Ca ²⁺	0,8 ± 0,2 ^b		1,8 ± 1,0		1,4 ± 0,4		1,6 ± 0,5	
Urin/Plasma Cl ⁻	1,6 ± 0,5		1,0 ± 0,2		1,9 ± 0,3		1,1 ± 0,2	
Urin/Plasma Mg ²⁺	38 ± 13		29 ± 7		53 ± 14		35 ± 11	
Urin/Plasma Pi	101 ± 35		18 ± 15		115 ± 29		29 ± 19	
Urin/Plasma Kreatinin	1058 ± 196		442 ± 123 ^b		916 ± 233		300 ± 71	
Urin/Plasma Harnstoff	189 ± 53		45 ± 10 ^b		262 ± 115		59 ± 8	
Urin/Plasma Harnsäure	6,9 ± 4,5		0,5 ± 0,3 ^a		7,3 ± 4,6		0,9 ± 0,3	
FE Na ⁺ (%)	0,10 ± 0,03		0,16 ± 0,04 ^d		0,13 ± 0,04		0,26 ± 0,10	
FE K ⁺ (%)	7,5 ± 1,1 ^b		11,8 ± 2,4 ^c		11,4 ± 3,2		19,1 ± 3,8	
FE Ca ²⁺ (%)	0,08 ± 0,02 ^b		0,38 ± 0,13 ^a		0,16 ± 0,05		0,54 ± 0,13	
FE Cl ⁻ (%)	0,16 ± 0,05 ^a		0,25 ± 0,06 ^a		0,22 ± 0,05		0,39 ± 0,12	
FE Mg ²⁺ (%)	3,6 ± 0,7 ^b		6,9 ± 1,8 ^c		5,9 ± 1,6		11,6 ± 2,1	
FE Pi (%)	10,1 ± 5,1		4,4 ± 3,4 ^a		13,3 ± 5,0		9,8 ± 5,8	
FE Harnstoff (%)	17,8 ± 3,3 ^a		10,5 ± 2,5 ^c		29,1 ± 11,7		20,4 ± 5,4	
FE Harnsäure (%)	0,6 ± 0,37		0,1 ± 0,04 ^c		0,8 ± 0,26		0,3 ± 0,08	

Alter der Mäuse: 39–42 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus;

Pi: Phosphat (anorganisch); FE: fraktionale Exkretion; MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung;

^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's *t*-Test: ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001; n.s.: nicht signifikant



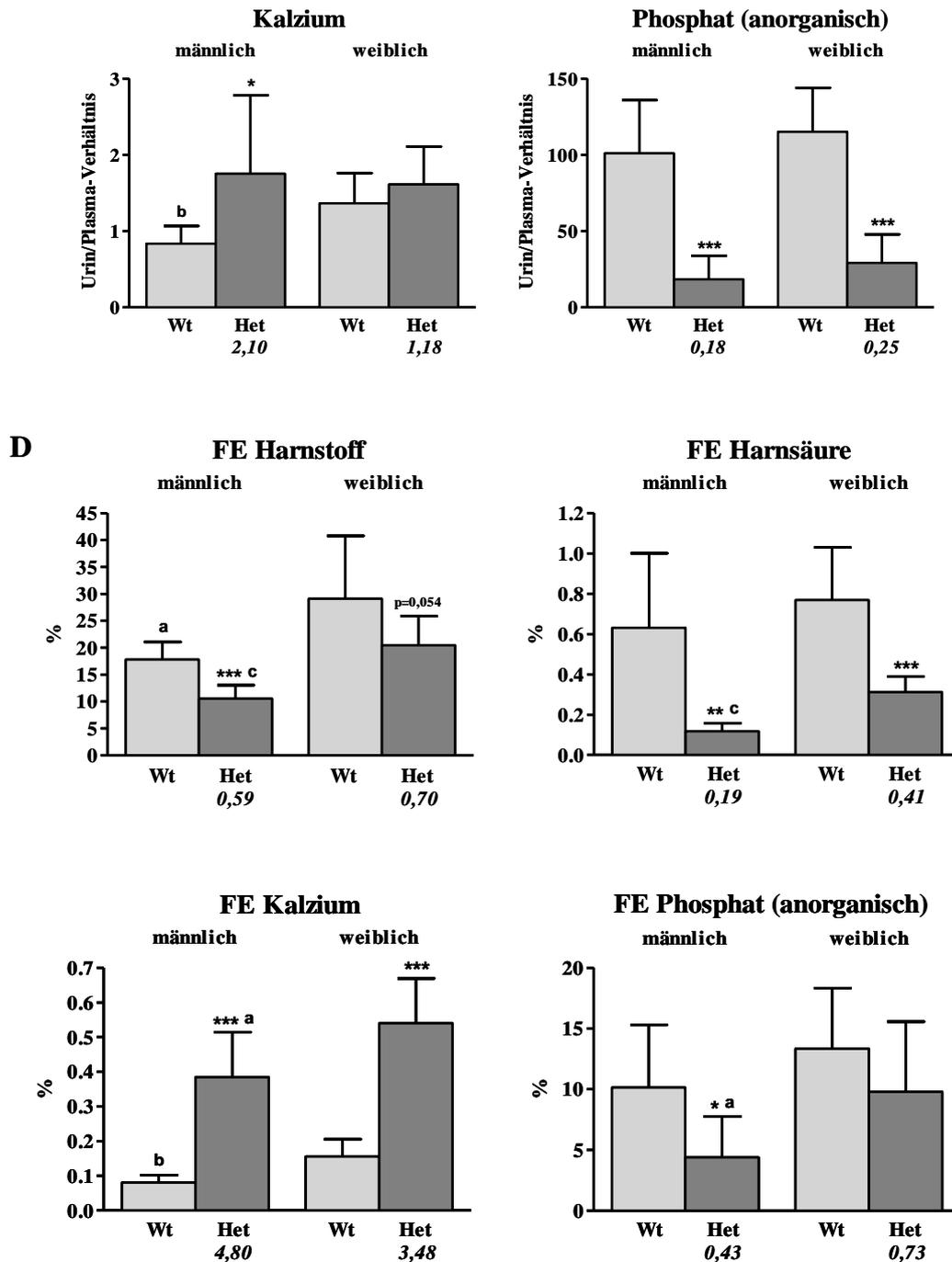


Abbildung 11: Ausgewählte Nierenfunktionsparameter von 39–42 Wochen alten Mäusen

(A–D) Anzahl der Mäuse: 7–10 pro Genotyp und Geschlecht; Mittelwerte + Standardabweichungen; Verhältnisse im Bezug zu den Wildtypen sind in kursiv dargestellt. Wt: Wildtypen; Het: heterozygote Mutanten; FE: fraktionierte Exkretion; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, *, **, *** Mutanten verglichen mit Wildtypen, Student's *t*-Test: * ^a $p < 0,05$, ** ^b $p < 0,01$, *** ^c $p < 0,001$

Auch nach Wasserentzug für 18 Stunden schieden die heterozygoten mutanten Mäuse beider Geschlechter mehr Urinvolumen aus als die Wildtypiere (männlich: 1,4fach – $p = 0,13$; weiblich: 1,5fach – $p = 0,09$) und hatten eine signifikant verringerte Harnosmolalität. Bei den mutanten Tieren beider Geschlechter war die Ausscheidung von Kalzium signifikant erhöht (2–2,6fach) und von Harnsäure, Gesamtprotein, Albumin und Phosphat verringert (Tabelle 34).

Tabelle 34: Harndaten von 39–42 Wochen alten Mäusen nach Wasserentzug für 18 Stunden

	männlich				weiblich			
	Wt		Het		Wt		Het	
	n=6-7 MW ± SD	n=8-9 MW ± SD	n=8-9 MW ± SD	Het MW ± SD	n=5-8 MW ± SD	n=9-10 MW ± SD	Het MW ± SD	Het MW ± SD
Wasserentzug für 18 h								
Harnvolumen (ml)	0,69 ± 0,35	0,97 ± 0,34		n.s.	0,49 ± 0,26	0,73 ± 0,29		$p=0,087$
Urin-Osmolalität (mOsm/kg H ₂ O)	3743 ± 631	2498 ± 377		$p<0,001$	3899 ± 798	2568 ± 443		$p<0,01$
Na ⁺ (µmol)	182 ± 81	184 ± 63		n.s.	165 ± 64	149 ± 53		n.s.
K ⁺ (µmol)	339 ± 135	355 ± 117		n.s.	296 ± 132	295 ± 100		n.s.
Ca ²⁺ (µmol)	1,6 ± 0,6	4,2 ± 1,7		$p<0,01$	1,6 ± 0,6	3,1 ± 1,2		$p<0,01$
Cl ⁻ (µmol)	215 ± 78	224 ± 67		n.s.	230 ± 74	187 ± 68		n.s.
Mg ²⁺ (µmol)	25,6 ± 11,2	25,6 ± 9,3		n.s.	26,4 ± 14,1	23,0 ± 7,2		n.s.
Pi (µmol)	125 ± 61	70 ± 47 ^a		$p=0,061$	98 ± 62	32 ± 26		$p<0,01$
Kreatinin (µmol)	4,7 ± 2,2	3,8 ± 1,4 ^a		n.s.	3,8 ± 1,6	2,7 ± 0,8		$p=0,058$
Harnstoff (mmol)	1,18 ± 0,50	1,14 ± 0,37		n.s.	1,02 ± 0,48	0,95 ± 0,31		n.s.
Harnsäure (nmol)	759 ± 357	227 ± 93		$p<0,001$	973 ± 352	248 ± 71		$p<0,001$
Glukose (µmol)	1,6 ± 0,7	1,4 ± 0,5		n.s.	1,6 ± 0,7	1,3 ± 0,8		n.s.
Gesamtprotein (mg)	8,0 ± 3,7 ^c	4,0 ± 1,9 ^c		$p<0,05$	1,5 ± 0,9	0,5 ± 0,2		$p<0,01$
Albumin (µg)	182 ± 111	54 ± 24		$p<0,01$	150 ± 96	45 ± 15		$p<0,01$

Alter der Mäuse: 39–42 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus; h: Stunde; Pi: Phosphat (anorganisch);

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a, b, c}: Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's *t*-Test: ^a $p<0,05$, ^b $p<0,01$, ^c $p<0,001$; n.s.: nicht signifikant

Die Uromodulinausscheidung im Urin war bei den heterozygoten Mutanten beider Geschlechter gegenüber den Kontrolltieren hochgradig reduziert (Abbildung 12). Jedoch enthielt der Harn heterozygot mutanter Tiere noch geringe Mengen Uromodulin (nicht gezeigt).

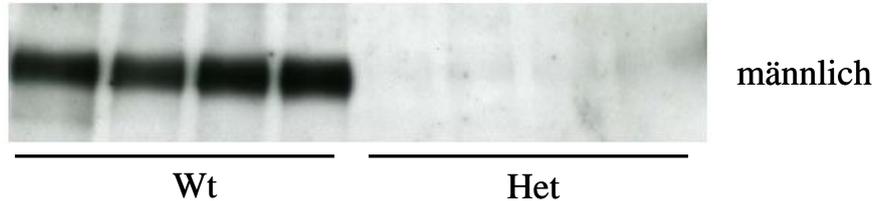


Abbildung 12: Westernblot-Analyse des Uromodulins im Urin von 39–42 Wochen alten Mäusen

Die Westernblot-Analyse des Uromodulins im Urin, normalisiert für Kreatinin, zeigt die stark reduzierte Ausscheidung von Uromodulin mit dem Harn bei heterozygoten Mutanten im Vergleich zu Kontrolltieren. Vier männliche Tiere pro Genotyp sind abgebildet; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten.

1.3.3.2. Langzeitwirkung der Hyperkalziurie

Zur Untersuchung der Langzeitwirkung der ausgeprägten Hyperkalziurie wurde eine Doppellröntgenabsorptiometrie (dual-energy X-ray absorptiometry, DXA) zur Knochendichtemessung des gesamten Körpers exklusive des Schädels bei 40 Tieren (männlich: 10 Wt, 10 Het; weiblich: 10 Wt, 10 Het) im Alter von 35–36 Wochen nach Standardprotokoll (FUCHS et al., 2006; FUCHS et al., 2011) durchgeführt.

Im Vergleich zu den Wildtypkontrolltieren wurden bei männlichen und weiblichen heterozygot mutanten Tieren Anzeichen einer Osteopenie festgestellt, die sich in einer signifikanten Verringerung von Knochenmineraldichte, Knochenmineralgehalt (= Knochenmasse) und Prozent Knochenmineralgehalt (= Prozent Knochenmasse) zeigte (Tabelle 35). Die spezifische Knochenmineraldichte (= Knochenmineraldichte/Körpergewicht) war signifikant erhöht. Des Weiteren wurde durch die DXA-Analyse die Körperzusammensetzung der Mäuse gemessen. Die Fettmasse und der Fettgehalt (= Prozent Körperfett) waren bei heterozygoten Mutanten beider Geschlechter stark verringert, während der fettfreie Gehalt (= Prozent fettfreie Masse) stark erhöht war (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 35: DXA-Analyse von 35–36 Wochen alten Mäusen

	männlich				weiblich			
	Wt		Het		Wt		Het	
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Knochenmineraldichte (mg/cm ²)	63 ± 2	53 ± 2	66 ± 4	54 ± 3	66 ± 4	54 ± 3	54 ± 3	54 ± 3
Knochenmineralgehalt (mg)	853 ± 158	540 ± 36,8 ^a	887 ± 224	491 ± 50	887 ± 224	491 ± 50	491 ± 50	491 ± 50
Knochenmineralgehalt (%)	2,24 ± 0,33	1,85 ± 0,10	2,45 ± 0,51	1,94 ± 0,13	2,45 ± 0,51	1,94 ± 0,13	1,94 ± 0,13	1,94 ± 0,13

Alter der Mäuse: 35–36 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus;

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's *t*-Test: ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001

1.3.3.3. Kreislaufdaten von 32–38 Wochen alten heterozygoten Mutanten

Zur Untersuchung des Kreislaufes wurden Blutdruckmessungen, Echokardiographie und die Messung des N-terminalen Fragments vom pro-atrialen natriuretischen Peptid (Nt-proANP) durchgeführt. Blutdruckmessungen wurden an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit einer nicht-invasiven, computergesteuerten Schwanzmaschette des MC4000 Blutdruckgerätes (Hatteras Instruments., Cary, North Carolina, USA) bei 32–33 Wochen alten Mäusen (Anzahl 40; 10 pro Genotyp und Geschlecht) durchgeführt. Die Mäuse waren dabei bei Bewusstsein (HOELTER et al., 2008). Die Echokardiographie wurde bei 34 (männlich: 8 pro Genotyp; weiblich: 9 pro Genotyp) anästhesierten 36–38 Wochen alten Mäusen unter Verwendung eines Ultraschall-Biomikroskops (Vevo 660, VisualSonics, Toronto, Ontario) durchgeführt. Blutplasma-Nt-proANP-Konzentrationen wurden quantitativ bei 35–36 Wochen alten Mäusen (Anzahl 39; männlich: 9 Wt, 10 Het; weiblich: 9 Wt, 11 Het) unter Verwendung eines kommerziellen Nt-proANP-enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) (Biomedica Medizinprodukte, Wien, Österreich) bestimmt.

Die Blutdruckanalysen ergaben keinen genotypspezifischen Unterschied (Daten nicht gezeigt). Herzfrequenz, linksventrikulärer Innendurchmesser in der Systole und Diastole und linksventrikuläres Volumen in der Systole und Diastole waren bei den heterozygoten Mutanten beider Geschlechter verringert. Die Plasmakonzentration des N-terminalen Fragments vom pro-atrialen natriuretischen Peptid zeigte eine Steigerung bei den heterozygoten Mutanten (Tabelle 36).

Tabelle 36: Echokardiographie- und Nt-proANP-Daten von 35–38 Wochen alten Mäusen

	männlich				weiblich			
	Wt		Het		Wt		Het	
	n=8/Nt-proANP MW ± SD	n=9 MW ± SD	n=8/Nt-proANP MW ± SD	n=10 MW ± SD	n=9 MW ± SD	n=9/Nt-proANP MW ± SD	n=11 MW ± SD	n=11 MW ± SD
LVID Diastole (mm)	4,1 ± 0,3 ^a		3,7 ± 0,2		3,9 ± 0,2	3,5 ± 0,4		p<0,01
LVID Systole (mm)	2,8 ± 0,5		2,4 ± 0,5		2,5 ± 0,4	2,1 ± 0,3		p<0,05
Herzfrequenz (Schläge/Minute)	445 ± 39		399 ± 33		457 ± 43	399 ± 34		p<0,01
Fraktionelle Verkürzung (%)	34 ± 7		35 ± 10		37 ± 7	39 ± 4		n.s.
LV Volumen Diastole (ml)	76 ± 13 ^a		59 ± 8		65 ± 9	50 ± 12		p<0,01
LV Volumen Systole (ml)	30 ± 13		22 ± 12		22 ± 9	15 ± 5		p=0,059
Auswurfraction (%)	62 ± 10		64 ± 14		67 ± 9	70 ± 5		n.s.
Nt-proANP (nmol/l)	0,8 ± 0,2 ^b		1,2 ± 0,3 ^b		1,7 ± 0,7	2,2 ± 0,8		n.s.

Alter der Mäuse: 35–38 Wochen; Wt: Wildtypiere; Het: heterozygote Mutanten; n: Anzahl; vs.: versus;

LVID: linksventrikulärer Innendurchmesser; LV: linksventrikulär; Nt-proANP: N-terminales Fragment vom pro-atrialen natriuretischen Peptid;

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; ^{a, b, c} Geschlechtervergleich innerhalb der Gruppen, Student's *t*-Test: ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001; n.s.: nicht signifikant

2. Mauslinie SMA002

2.1. Ausgangspunkt der Arbeit

Innerhalb der phänotyp-basierten Untersuchung des Münchener ENU-Mausmutageneseprojekts fiel das weibliche F1-Tier Nr. 20003468 aufgrund ihres starken Wachstumsdefizits auf. Nach erfolgreicher Verpaarung zeigten die phänotypisch mutanten Nachkommen neben dem Wachstumsdefizit (Abbildung 13A) Anzeichen von auffälligem Verhalten wie abrupte Körperzuckungen und häufiges „Kratzen“ bzw. „Putzen“ (Abbildung 13B). Mit diesen Hauptsymptomen wurde die dominante Linie SMA002 etabliert (HOWALDT, 2004). Die Züchtung dieses Phänotyps auf dem genetischen Hintergrund des C3H-Inzuchtstammes für mehr als zehn Generationen bestätigte die Vererbbarkeit.

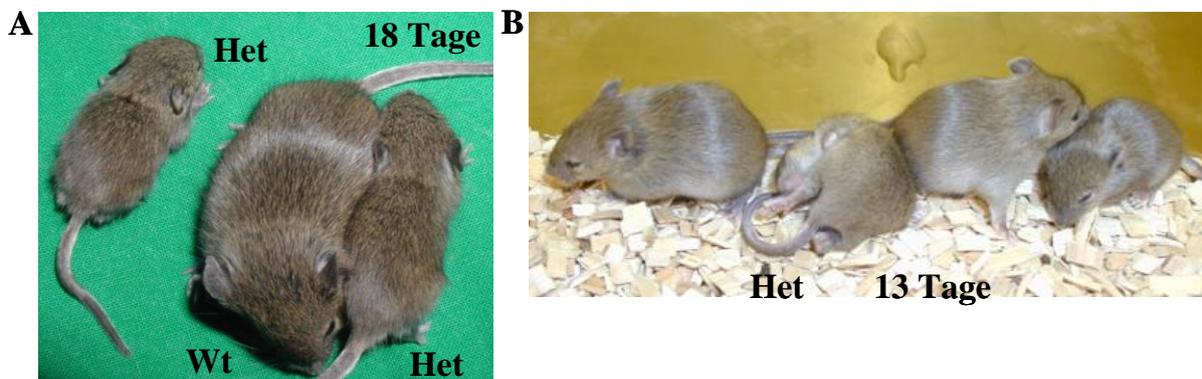


Abbildung 13: Wachstumsdefizit und Kratzverhalten der Mauslinie SMA002

(A) Wachstumsdefizit der phänotypischen heterozygoten Mutanten im Vergleich zu ihren Kontroll-Wurfgeschwistern im Alter von 18 Tagen; Wt: phänotypisches WildtypTier; Het: phänotypische heterozygote Mutanten; (B) abrupt auftretendes, ausgeprägtes Kratzverhalten von phänotypischen heterozygoten Mutanten im Alter von 13 Tagen.

In einer früheren Doktorarbeit wurde eine basale phänotypische Beschreibung dieser Linie durchgeführt (HOWALDT, 2004). Da die ursächliche Mutation unbekannt war, erfolgte die Untersuchung von heterozygot mutanten Tieren im Vergleich zu Wildtypwurfgeschwistern, wobei die Tiere anhand des Wachstumsdefizits in Verbindung mit dem abnormen Verhalten phänotypisch den beiden Gruppen zugeordnet wurden. Es zeigte sich eine vollständige phänotypische Penetranz der Mutation. Die Analysen beinhalteten eine morphologische Untersuchung (B6C3F1-Hybridmäuse, 25 Wochen p.p.), eine Untersuchung der Körpergewichtsentwicklung (0–10, 14, 21 Tage p.p., 3–26 Wochen p.p.), eine klinisch-chemische wie hämatologische Untersuchung (12 Wochen p.p.) und eine Untersuchung der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren sowie des IGF-Bindungsproteins 2 (8–20 Wochen p.p.).

Zur Kartierung der Mutation wurde C57BL/6 als zweiter Inzuchtstamm verwendet. Je 20 phänotypische heterozygote Mutanten und Wildtypiere der zweiten Generation mit gemischtem genetischem Hintergrund wurden mit Hilfe eines genomweiten Sets von 57 polymorphen Mikrosatellitenmarkern untersucht. Die ursächliche Mutation wurde auf Chromosom 13 zwischen den Mikrosatellitenmarkern D13Mit20 (55,7 Mb) und D13Mit253 (64,1 Mb) kartiert (HOWALDT, 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die weiterführende genotypische und phänotypische Untersuchung der Linie SMA002. Im Einzelnen sollten besonders folgende Analysen durchgeführt werden:

- Weitere Charakterisierung der chromosomalen Lage zur Identifizierung der ursächlichen Mutation und Untersuchung von Kandidatengenen
- Zucht eines kongenen Stammes

2.2. Untersuchung der ursächlichen Mutation

2.2.1. Feinkartierung

Zur Bestätigung der bereits vorliegenden Ergebnisse wurden Proben von 229 phänotypischen heterozygoten Mutanten und von 16 phänotypischen Wildtypieren (erstellt in der früheren Doktorarbeit) mit zwei polymorphen Mikrosatellitenmarkern (D13Mit13 und D13Mit253) untersucht (Abbildung 14). Zur weiteren Eingrenzung der kartierten Region von 56,6 Mb (Marker D13Mit13) bis 64,1 Mb (Marker D13Mit253) wurden dieselben Wildtypiere ($n = 16$) mit zehn SNPs untersucht, ebenso wie 9 Tiere der 229 phänotypischen heterozygoten Mutanten, die bei einem der Mikrosatellitenmarker den Genotyp C57BL/6 / C57BL/6 und bei dem anderen Mikrosatellitenmarker den Genotyp C3H / C57BL/6 zeigten (Abbildung 14). 15 Tiere der 229 phänotypischen heterozygoten Mutanten, die bei beiden Mikrosatellitenmarkern den Genotyp C57BL/6 / C57BL/6 zeigten, wurden mit den zehn SNPs und weiteren zwei Mikrosatellitenmarkern (D13Mit64 und D13Mit9) untersucht (Abbildung 14). Die SNPs wurden aufgrund der Information in Datenbanken ausgewählt, die für C3H und C57BL/6 einen Nukleotidpolymorphismus angaben.

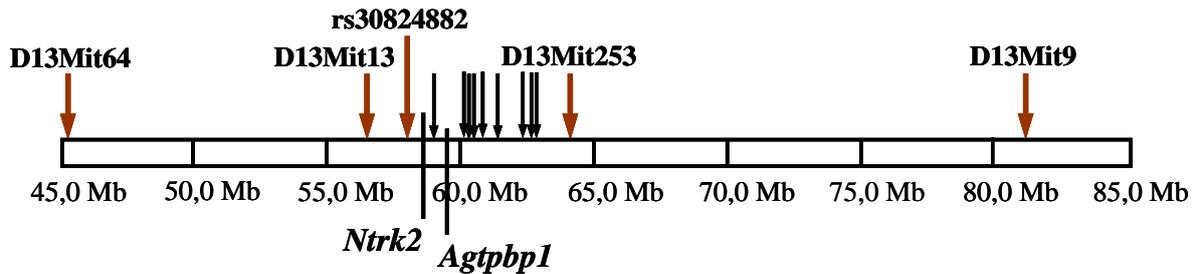


Abbildung 14: Lokalisation der DNA-Marker zur Feinkartierung auf Chromosom 13 und der Kandidatengene der Linie SMA002

Rote Pfeile: Lage der polymorphen DNA-Marker (vier Mikrosatelliten und ein SNP); schwarze Pfeile: Lage der neun SNPs, die sich in der Untersuchung als nicht polymorph bei C3H und C57BL/6 herausstellen; *Ntrk2* und *Agtpbp1*: Lage der Kandidatengene.

In der eigenen Untersuchung stellten sich neun der zehn SNPs als nicht polymorph für C3H und C57BL/6 heraus, d.h. es trat kein Restriktionsenzym polymorphismus bei den entsprechenden PCR-Produkten auf (Abbildung 14/Tabelle 37).

Tabelle 37: SNP-Marker auf Chromosom 13 ohne Polymorphismus in C3H und C57BL/6

Locus (Mb)	DNA-Marker (SNP)	Restriktionsenzym	Beschriebener Polymorphismus ^a (Genotyp)	Ermittelter Genotyp (Genotyp)
59,1	rs29494017	BtsI	C/C / T/T	T/T / T/T
60,3	rs29680923	BclI	T/T / C/C	C/C / C/C
60,4	rs29954752	MphI 103I (NsiI)	A/A / G/G	G/G / G/G
60,5	rs29980684	NcoI	C/C / T/T	T/T / T/T
60,9	rs29830130	BsrI	G/G / C/C	G/C / G/C
61,5	rs29781003	RsaI	T/T / C/C	C/C / C/C
62,3	rs29683144	CseI (HgaI)	C/C / A/A	A/A / A/A
62,8	rs29493562	BsmI	G/G / A/A	A/A / A/A
62,9	rs6295946	BspTI (AflII)	C/C / T/T	T/T / T/T

Mb: Megabasen; SNP: Einzelnukleotid-Polymorphismus;

^a<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/MouseSNP.cgi>; <http://www.informatics.jax.org/>

Von den insgesamt fünf untersuchten polymorphen Markern zeigten die Ergebnisse der mit D13Mit13 und D13Mit253 untersuchten 229 phänotypischen heterozygoten Mutanten eine erwartete Genotypverteilung. Dabei wurde die höchste Kopplung ($\chi^2 = 166,5$) zum Marker

D13Mit13 bei 56,6 Mb festgestellt (<http://www.ensembl.org>; NCBI m37 mouse assembly) (Tabelle 38). Auch die Ergebnisse der Feinkartierung von 16 phänotypischen Wildtyptieren mit drei der fünf polymorphen Marker zeigten eine erwartete Genotypverteilung (Tabelle 39).

Tabelle 38: Feinkartierung mit phänotypischen heterozygoten Mutanten der Linie SMA002

Locus Chr 13 (Mb)	DNA-Marker	Genotyp		Fehler (n)	Gesamt ph. Het (n)	χ^2
		C3H C57BL/6 (n)	C57BL/6 C57BL/6 (n)			
56,6	D13Mit13	210	16	3	229	166,5
64,1	D13Mit253	199	23	7	229	139,5

Chr: Chromosom; Mb: Megabasen; n: Anzahl der N2-Tiere; ph. Het: phänotypische heterozygote Mutanten

Tabelle 39: Feinkartierung mit phänotypischen Wildtyptieren der Linie SMA002

Locus Chr 13 (Mb)	DNA-Marker	Genotyp		Fehler (n)	Gesamt ph. Wt (n)	χ^2
		C3H C57BL/6 (n)	C57BL/6 C57BL/6 (n)			
56,6	D13Mit13	2	14	0	16	9,0
58,0	rs30824882	2	11	3	16	6,2
64,1	D13Mit253	2	14	0	16	9,0

Chr: Chromosom; Mb: Megabasen; n: Anzahl der N2-Tiere; ph. Wt: phänotypische Wildtyptiere

Die Ergebnisse von 24 phänotypischen heterozygoten Mutanten, die in der untersuchten chromosomalen Region nicht kontinuierlich einen heterozygoten Genotyp (C3H / C57BL/6) zeigten, sind in Tabelle 40 dargestellt.

Tabelle 40: Feinkartierung bei phänotypischen heterozygoten Mutanten ohne kontinuierlichen heterozygoten Genotyp im untersuchten Genombereich

Maus-ID	D13Mit64 45,2 Mb	D13Mit13 56,6 Mb	rs30824882 58,0 Mb	D13Mit253 64,1 Mb	D13Mit9 81,2 Mb
20018898	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20020701	C3H / C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20020602	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20019491	n.u.	C3H / C57BL/6	C3H / C57BL/6	C57BL/6	n.u.
20019675	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20019478	C3H / C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20019399	n.u.	C57BL/6	C57BL/6	C3H / C57BL/6	n.u.
20020348	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20020588	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C3H / C57BL/6
20019964	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20020779	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20020426	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20020405	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20020363	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20021067	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20021743	n.u.	C3H / C57BL/6	n.a.	C57BL/6	n.u.
20021547	C3H / C57BL/6	C57BL/6	n.a.	C57BL/6	C57BL/6
20021893	n.u.	C3H / C57BL/6	C3H / C57BL/6	C57BL/6	n.u.
20022860	n.u.	C3H / C57BL/6	C3H / C57BL/6	C57BL/6	n.u.
20023431	n.u.	C3H / C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	n.u.
20025285	n.u.	C3H / C57BL/6	n.a.	C57BL/6	n.u.
20026513	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
20026514	n.u.	C3H / C57BL/6	n.a.	C57BL/6	n.u.
20026810	n.u.	C3H / C57BL/6	n.a.	C57BL/6	n.u.

Mb: Megabasen; C57BL/6: homozygoter Genotyp; C3H / C57BL/6: heterozygoter Genotyp;
n.u.: nicht untersucht; n.a.: nicht auswertbar

2.2.2. Kandidatengenanalyse

Nach Datenbankanalysen und Literaturrecherchen wurde innerhalb der kartierten chromosomalen Region zunächst *Ntrk2* (neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2) bei 58,9 Mb als Kandidatengen untersucht. Die vollständige Sequenzierung des cDNA-Transkriptes 1 (NCBI GenBank Accession-No. NM_001025074.1; 4614 nt) und die teilweise Sequenzierung des cDNA-Transkriptes 2 (NCBI GenBank Accession-No. NM_008745.2; 7022 nt), im nicht mit dem Transkript 1 übereinstimmenden Bereich (Abbildung 15) bei zwei phänotypisch mutanten Mäusen und zwei phänotypischen Wildtyptieren ergab keinen Unterschied zu der Datenbanksequenz.

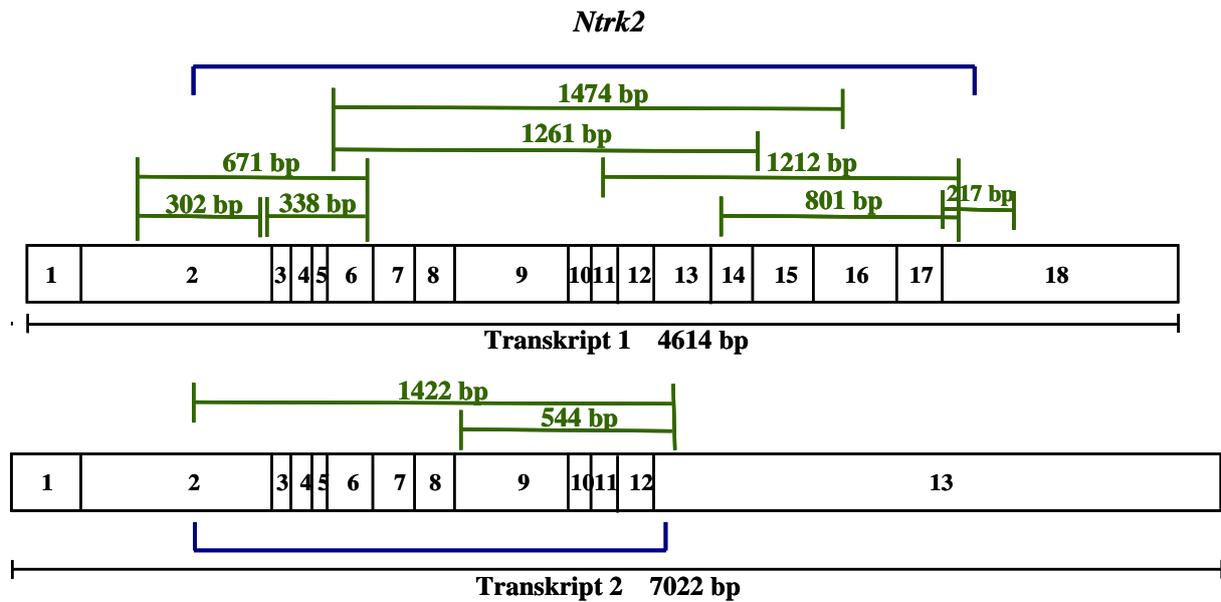


Abbildung 15: Transkripte des Kandidatengens *Ntrk2* mit den zur Sequenzanalyse verwendeten Primerpaaren

Transkript 1 und Transkript 2 des *Ntrk2*-Gens; Rechtecke mit Ziffern: Exons; blau: translatierter Bereich der Transkripte; eingezeichnet sind die PCR-Produkte der verwendeten Primerpaare mit ihren Basenlängen; bp: Basenpaare.

Anschließend wurde das Kandidatengens *Agtpbp1* (ATP/GTP binding protein 1) bei 59,6 Mb für die Sequenzanalyse ausgewählt. Sequenziert wurden die cDNA des Transkripts 1 (NCBI GenBank Accession-No. NM_023328.2; 4389 nt) und die genomische DNA um Exon 18 (NCBI GenBank Accession-No. NC_000079.5; 107785 nt) (Abbildung 16) von drei phänotypischen heterozygoten Mutanten und von einer bis zwei C3H-Mäusen aus der Stammzucht. Es wurde kein Unterschied zu der Datenbanksequenz ermittelt.

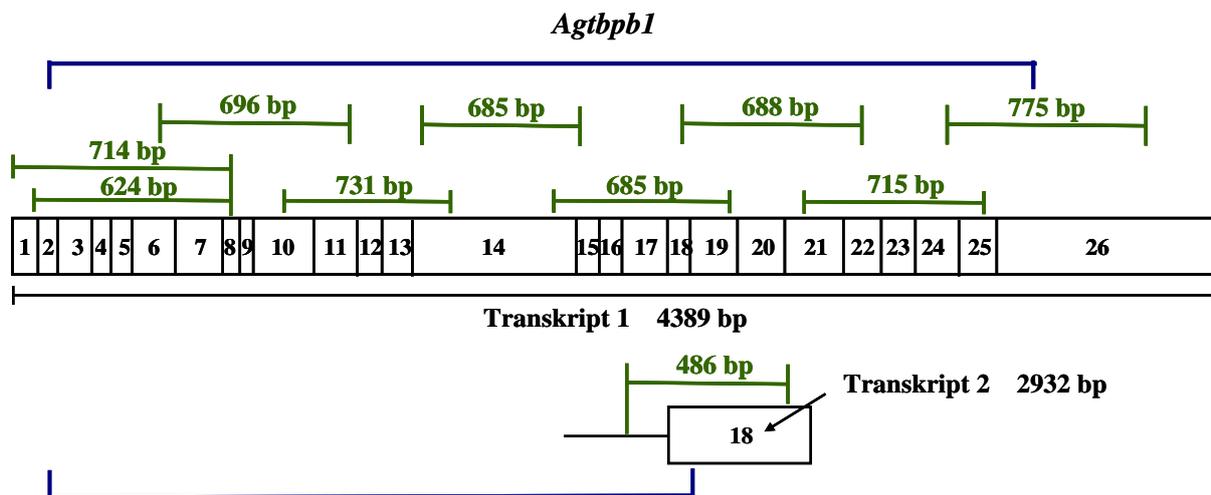


Abbildung 16: Transkripte des Kandidatengens *Agtbpb1* mit den zur Sequenzanalyse verwendeten Primerpaaren

Transkript 1 und Exon 18 des Transkripts 2, das verschieden ist zu Exon 18 des Transkripts 1; Rechtecke mit Ziffern: Exons; blau: translatierter Bereich der Transkripte; eingezeichnet sind die PCR-Produkte der verwendeten Primerpaare mit ihren Basenlängen; bp: Basenpaare.

2.2.3. Untersuchung des Auftretens homozygoter Mutanten

Die Anpaarung von phänotypisch heterozygoten Mutanten in der vorherigen Doktorarbeit erbrachte Nachkommen, von denen vier Wochen p.p. nur mehr 40 % lebten. Von diesen lebenden Tieren wurde nur ca. ein Drittel als phänotypisch mutante Tiere eingestuft (HOWALDT, 2004). Damit stellte sich die Frage, ob homozygot mutante Tiere in dieser Linie lebensfähig sind. Zur Beantwortung dieser Frage wurden F2-Hybridtiere durch die Anpaarung von phänotypisch heterozygot mutanten F1-Hybridtieren mit dem genetischen Hintergrund der Inzuchtstämme C3H und C57BL/6 gezüchtet. Statt mit der noch nicht identifizierten ursächlichen Mutation wurden die Tiere mit den zwei eng gekoppelten polymorphen Mikrosatellitenmarkern D13Mit13 (56,6 Mb) und D13Mit253 (64,1 Mb) genotypisch untersucht.

Es wurden Gewebeproben von 108 Embryonen am Tag 14,5 der Trächtigkeit und 28 neugeborenen Tieren analysiert. Bei den untersuchten Embryonen zeigte der Mikrosatellitenmarker D13Mit13 eine Genotypverteilung von 25 % C3H / C3H, 45 % C3H / C57BL/6 und 30 % C57BL/6 / C57BL/6 (Allelverteilung: 101 × C57BL/6-Allel; 91 × C3H-Allel). Beim Marker D13Mit253 wurde eine Genotypverteilung von 24 % C3H / C3H, 46 % C3H / C57BL/6 und 30 % C57BL/6 / C57BL/6 (Allelverteilung: 103 × C57BL/6-Allel; 93 × C3H-Allel) festgestellt. Bei den neugeborenen Mäusen wurde mit dem DNA-Marker D13Mit13 eine Genotypverteilung von 32 % C3H / C3H, 36 % C3H / C57BL/6 und 32 % C57BL/6 / C57BL/6 (Allelverteilung: 28 × C57BL/6-Allel; 28 × C3H-Allel) festgestellt und

beim Marker D13Mit253 kam es zu einer Genotypverteilung von 35 % C3H / C3H, 25 % C3H / C57BL/6 und 40 % C57BL/6 / C57BL/6 (Allelverteilung: 21 × C57BL/6-Allel; 19 × C3H-Allel). Die für die Allelverteilung ermittelten χ^2 -Werte zeigen keine Unterschiede der aufgetretenen Allelverteilung und der nach den Mendel'schen Regeln erwarteten Allelverteilung an (Tabelle 41).

Tabelle 41: Genotypdaten aus Anpaarungen von heterozygot mutanten F1-Hybridtieren

Zeitpunkt	Locus Chr 13	Mikrosatellit	Genotyp				Gesamt	χ^2	Fehler Reabsorbiert	
			C3H C3H	C3H C57BL/6	C57BL/6 C57BL/6	n (%)			n	n
		Mb	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)				
E 14,5	56,6	D13Mit13	24 (25)	43 (45)	29 (30)	96 (100)	0,5	2	10	
	64,1	D13Mit253	24 (24)	45 (46)	29 (30)	98 (100)	0,5	0	10	
0–2 Tage p.p.	56,6	D13Mit13	9 (32)	10 (36)	9 (32)	28 (100)	0,0	0	./.	
	64,1	D13Mit253	7 (35)	5 (25)	8 (40)	20 (100)	0,1	8	./.	

Chr: Chromosom; Mb: Megabasen; n: Anzahl; E: Tag der Trächtigkeit; p.p.: post partum

2.2.4. Zucht eines kongenen Stammes

Die Zucht eines kongenen Stammes ermöglicht die Übertragung und Untersuchung eines Allels in den genetischen Hintergrund eines zweiten Mausstamms. Dies erfolgt in der Regel durch zehnmalige Rückkreuzung von Tieren mit dem interessierenden Allel auf den neuen Stamm. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Erstellung eines kongenen Stammes mit C57BL/6-Mäusen als zweiten Inzuchtstamm bis zur Generation N6 (Abbildung 17A). Die Zucht von phänotypischen heterozygot mutanten Mäusen mit C57BL/6-Tieren zeigte in den fortschreitenden Generationen Auffälligkeiten. Die Anpaarungen ohne Nachkommen und die Aufzuchtverluste wenige Tage nach der Geburt erschienen erhöht zu sein. Des Weiteren erschienen Körpergewicht und Körpergröße der Nachkommen von Generation zu Generation reduziert zu sein (keine Daten erhoben) (Abbildung 17B).

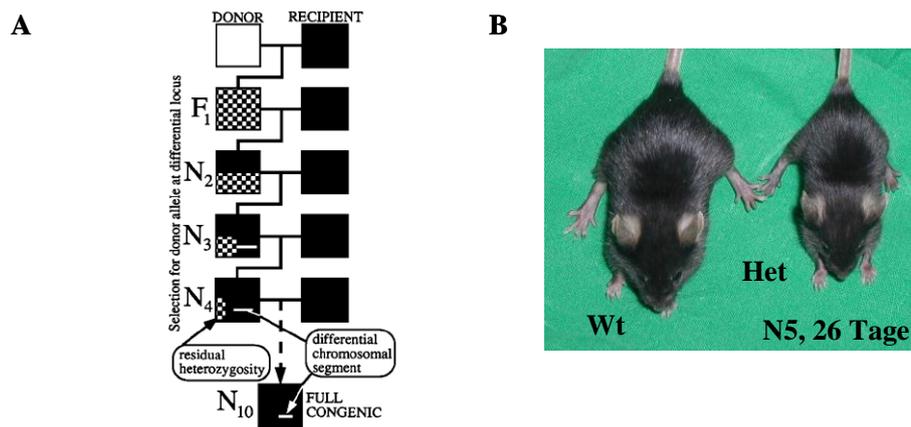


Abbildung 17: Erstellung eines kongenen Stammes der Linie SMA002

(A) Schema zur Zucht eines kongenen Stammes (aus SILVER, 1995). Donor: phänotypisch heterozygot mutante C3H-Tiere; Recipient: C57BL/6. (B) Beispiel für den Größenunterschied zwischen phänotypisch heterozygoten Mutanten und Kontroll-Wurfgeschwistern der Generation N5 im Alter von 26 Tagen; Wt: phänotypisches Wildtypier; Het: phänotypische heterozygote Mutante.

2.3. Ausblick

Die Ergebnisse der Feinkartierung von phänotypischen heterozygoten Mutanten und phänotypischen Wildtypieren lassen vermuten, dass die phänotypische Einteilung in heterozygote Mutanten und Wildtypiere bei wenigen Tieren nicht den genotypischen Verhältnissen entspricht. Alternativ ist das Auftreten eines Austausches von nur kurzen chromosomalen Bereichen um die ursächliche Mutation herum möglich. Die Untersuchung von zehn SNPs in diesem Bereich zeigte bei neun Markern keinen Sequenzunterschied für C3H und C57BL/6. Somit könnte eine Feinkartierung der ursächlichen Mutation in Rückkreuzungstieren mit einem weiteren Inzuchtstamm (z.B. BALB/c) sinnvoll sein. Die Kandidatengene *Ntrk2* und *Agtpbp1* wurden aufgrund ihrer Lokalisation innerhalb der kartierten Region und der bei mutanten Mäusen dieser Gene beschriebenen neurologischen Verhaltensauffälligkeiten zur Sequenzanalyse ausgewählt. Da phänotypische heterozygote Mutanten und phänotypische Wildtypiere keine Sequenzunterschiede zeigten, sind weitere Kandidatengene zu untersuchen. Das Auftreten der erwarteten Allelverteilung bei neugeborenen F2-Hybridtieren mit dem genetischen Hintergrund der C3H- und C57BL/6-Inzuchtstämme zeigt die Lebensfähigkeit von homozygoten Mutanten zumindest in diesem gemischten genetischen Hintergrund an. Damit ist dieselbe Untersuchung bei älteren F2-Hybridtieren angezeigt, um festzustellen, wie lange homozygot mutante Tiere lebensfähig sind. Die bisherige Zucht des kongenen Stammes ist bis zur Generation N10 fortzuführen, um vergleichende Phänotypuntersuchungen der Mutation auf dem genetischen Hintergrund von C3H und C57BL/6 durchführen zu können. Dies könnte auch weitere Hinweise auf die ursächliche Mutation geben.

V. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden die ENU-induzierten mutanten Mauslinien HST001 und SMA002 untersucht. Da in der Linie SMA002 die ursächliche Mutation bisher noch nicht identifiziert wurde, wird sie in der folgenden Diskussion nicht weiter behandelt. Das weitere Vorgehen wurde bereits beschrieben (siehe IV.2.3). In der Mauslinie HST001 wurden die ursächliche Mutation identifiziert und der mutante Phänotyp untersucht. Diese Daten werden nachfolgend diskutiert.

1. Ursächliche Mutation im *Umod*-Gen

Heterozygote Mutanten der Mauslinie HST001 zeigten signifikant erhöhten Plasmaharnstoff, stark beeinträchtigte Harnkonzentrierungsfähigkeit, herabgesetzte fraktionelle Exkretion (FE) von Harnsäure, stark reduzierte Uromodulinausscheidung mit dem Harn, Hyperkalziurie, hochgradig reduziertes Körpergewicht und reduzierte Knochensubstanz.

Die ursächliche Punktmutation in der Linie HST001 befindet sich im *Umod*-Gen. Der identifizierte Basenpaar-Austausch G→T des Nukleotids 278 der translatierten *Umod*-cDNA führt zum Aminosäureaustausch von Cystein (C) zu Phenylalanin (F) an der Position 93 (C93F). C93 liegt in einer hochkonservierten Region innerhalb der Kalzium-bindenden EGF-ähnlichen Domäne II des Uromodulin-Proteins. In dieser wurden bereits zahlreiche Mutationen im *UMOD*-Gen identifiziert, die „Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankungen“ (UAKD) beim Menschen verursachen. Die meisten der mehr als 50 bekannten Mutationen im *UMOD*-Gen führen zu einem Aminosäureaustausch. Dabei sind 23 verschiedene Cystein-Aminosäuren betroffen (WILLIAMS et al., 2009; SCHAFFER et al., 2010; ZAUCKE et al., 2010). Cysteinreste bilden Disulfidbrücken aus, die für die Tertiärstruktur eines Proteins essenziell sind. Die Mutation C93F betrifft die Disulfidbrücke C93-C105 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q91X17>), die der Disulfidbrücke C94-C106 (<http://www.uniprot.org/uniprot/P07911>) beim Menschen entspricht, für die die Mutation C106Y bekannt ist (ZAUCKE et al., 2010). Ein Verlust der Disulfidbrücke führt zu einer fehlerhaften Proteinfaltung.

Die Folgen einer Mutation können mRNA-Instabilität, ungenügende Translation, Proteinreifungsstörung, fehlerhafte Lokalisation des mutanten Proteins in der Zelle und fehlende oder abnorme Funktion des mutanten Proteins sein. Da es sich bei Uromodulin um ein GPI-verankertes Glykoprotein handelt, das an der apikalen Zellmembran von TALH-

Zellen lokalisiert ist und durch proteolytische Spaltung in den Harn abgegeben wird (SERAFINI-CESSI et al., 2003), ist eine korrekte Proteinfaltung für den intrazellulären Transport vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat notwendig. Bei *UMOD*-Mutationen wurde aufgrund der fehlerhaften Proteinfaltung ein verzögerter Transport des Uromodulins zur Zellmembran festgestellt, da die Chaperone des ER nicht in der Lage sind, das Protein richtig zu falten. Dies führt zur Anreicherung des fehlgefalteten Uromodulins im ER (RAMPOLDI et al., 2003; BERNASCONE et al., 2006). Immunhistochemische Untersuchungen von TALH-Zellen mutanter Mäuse der Linie HST001 zeigten eine massive intrazelluläre Anreicherung von Uromodulin (Dr. E. Kemter, Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie). Ähnliche Veränderungen wurden bei der mutanten Mauslinie *Umod*^{A227T} (KEMTER et al., 2009), bei der transgenen Mauslinie Tg^{*Umod*C147W} (BERNASCONE et al., 2010) und bei Uromodulin-assoziierten Nierenerkrankungen des Menschen (RAMPOLDI et al., 2003; SCOLARI et al., 2004; VYLET'AL et al., 2006; NASR et al., 2008) festgestellt.

2. Uromodulinausscheidung

Als Folge der Anreicherung des Uromodulins im ER wurde in heterozygoten Mutanten der Linie HST001 in Westernblot-Analysen eine stark reduzierte Ausscheidung von Uromodulin mit dem Harn festgestellt. Analoge Ergebnisse zeigten auch quantitative und Westernblot-Untersuchungen bei homozygot mutanten Tieren der Linie *Umod*^{A227T} (KEMTER et al., 2009), bei der transgenen Mauslinie Tg^{*Umod*C147W} (BERNASCONE et al., 2010) und bei Menschen mit *UMOD*-Mutationen (REZENDE-LIMA et al., 2004; VYLET'AL et al., 2006). Bei der transgenen Mauslinie mit dem humanen mutierten *UMOD* (C148W) (TAKIUE et al., 2008a) wurde nicht von einer verringerten Uromodulin-Exkretion berichtet. Lhotta et al. (2009) zeigten, dass Kinder mit *UMOD*-Mutationen Uromodulin noch in physiologisch niedrigen Werten mit dem Harn ausscheiden, bei erwachsenen Patienten die Ausscheidung von Uromodulin aber hochgradig reduziert war. Bei Patienten mit Nierenversagen wurde kein Uromodulin im Harn mehr detektiert (REZENDE-LIMA et al., 2004). Es ist angezeigt, die Uromodulin-Exkretion bei der Mauslinie HST001 ab dem juvenilen Alter zu analysieren, um den Beginn und die Progression der reduzierten Uromodulin-Ausscheidung zu bestimmen.

3. „Gain-of-toxic-function“-Mutation von Uromodulin in der Niere

Heterozygot mutante Mäuse der Linie HST001 wiesen als Zeichen einer Nierenfunktionsstörung eine signifikante Beeinträchtigung der Harnkonzentrierungsfähigkeit

mit Polyurie, Polydipsie und einer signifikant verringerten Harnosmolalität auf. Die mutante Mauslinie *Umod*^{A227T} zeigte signifikante Veränderungen dieser Art nicht bei heterozygoten Mutanten, sondern erst bei homozygot mutanten Tieren (KEMTER et al., 2009). Auch die transgene Mauslinie Tg^{*Umod*C147W} wies ähnliche Veränderungen auf (BERNASCONE et al., 2010), wohingegen bei der transgenen Mauslinie mit dem humanen mutierten *UMOD* (C148W) keine Beeinträchtigung der Harnkonzentrationsfähigkeit festgestellt wurde (TAKIUE et al., 2008b). Beim Menschen führen Mutationen im *UMOD*-Gen ebenso zu Harnkonzentrationsstörungen mit reduzierter Harnosmolalität und Polyurie (RAMPOLDI et al., 2003). Da *Umod*-Knockout-Mäuse der Linie *Umod*^{tmlKuma}/*Umod*^{tmlKuma} bis auf eine reduzierte Kreatinin-Clearance keine beeinträchtigte Nierenfunktion aufwiesen (BACHMANN et al., 2005; MO et al., 2007), kann die Nierenfunktionsstörung der Linie HST001 nicht auf einen Funktionsverlust von Uromodulin zurückgeführt werden. Wie kommt es bei der Linie HST001 dann zur Beeinträchtigung der Harnkonzentrationsfähigkeit? Zur Konzentration des Harns sind viele Ionenporter und Ionenkanäle wie NKCC2, KCC4, ROMK und CLC-Kb (GAMBA, 2005) und eine Na⁺-K⁺-Pumpe im TALH notwendig. Die Resorption von 25 % des gefilterten Natriumchlorids führt zu einem hyperosmolaren Interstitium, das eine Harnkonzentration aufgrund des osmotischen Gradienten bewirkt. Uromodulin wird ebenfalls im TALH synthetisiert und ist mit dem apikalen NKCC2-Kotransporter und zum Teil mit der basolateralen Na⁺-K⁺-Pumpe in Mikrodomänen (= „Lipid rafts“) der Zellmembran von TALH-Zellen kolokalisiert (WELKER et al., 2007; WELKER et al., 2008). Somit beeinträchtigt die Anreicherung des Uromodulins im ER wahrscheinlich sekundär den Ionentransport in den TALH-Zellen.

Heterozygot mutante Tiere beider Geschlechter der Linie HST001 wiesen 39–42 Wochen p.p. eine ausgeprägte Hyperkalziurie (2,6–4,7fach) und heterozygot männliche Tiere ferner eine signifikant erhöhte Ausscheidung von Magnesium, Kalium und Natrium mit dem Harn auf. Weibliche Tiere zeigten eine moderate Exkretion von Magnesium und Kalium. Ähnliche Veränderungen wurden bei homozygot mutanten Tieren der Linie *Umod*^{A227T} im Alter von drei bis vier Monaten beobachtet. Bei heterozygot mutanten Tieren dieser Linie wurde bis auf eine erhöhte Kalzium- und Magnesiumexkretion bei den weiblichen Tieren keine Veränderung festgestellt (KEMTER et al., 2009). Tiere der transgenen Mauslinie Tg^{*Umod*C147W} im Alter von 18–21 Wochen zeigten eine erhöhte Kalziumausscheidung mit dem Harn (BERNASCONE et al., 2010). Bei Patienten mit *UMOD*-Mutationen wurde ebenso eine erhöhte Kalziumausscheidung mit dem Harn ermittelt (VYLET'AL et al., 2006). Im TALH erfolgt die Resorption ein- und zweiwertiger Kationen durch einen passiven, parazellulären

Transport, der durch elektrische Gradienten angetrieben wird (GREGER, 1985; GAMBA, 2005; SILBERNAGL, 2010). Die signifikant erhöhte Ausscheidung von Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie von K^+ und Na^+ deutet auf eine Beeinträchtigung dieses parazellulären Transportmechanismus hin. Die koordinierte Interaktion der Ionentransporter des TALH ist für den Aufbau des elektrischen Gradienten essenziell. *Umod*-Mutationen verursachen somit eine Funktionsstörung des TALH durch eine „gain-of-toxic-function“-Mutation, die durch andere Nephronabschnitte nicht kompensiert werden kann.

Neben der Hyperkalziurie wurden bei heterozygoten Mutanten beider Geschlechter eine signifikant erhöhte Plasmakalziumkonzentration und eine signifikant erhöhte Plasmaaktivität der alkalischen Phosphatase sowie bei weiblichen heterozygoten Mutanten darüber hinaus eine verminderte Plasmaphosphatkonzentration festgestellt. Bei beiden Geschlechtern zeigte sich eine ausgeprägte Osteopenie mit reduzierter Knochenmineraldichte und reduziertem Knochenmineralgehalt. Auch mutante Tiere der Mauslinie *Umod*^{A227T} entwickelten einen Osteopenie-Phänotyp, wobei nur männliche homozygot mutante Tiere analoge Veränderungen in den Plasmawerten zeigten (KEMTER et al., 2009). Diese Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass ein erhöhter Knochenumbau und/oder eine defekte Mineralisierung der Knochen stattfanden.

Die Untersuchungen der Linie HST001 ergaben des Weiteren bei männlichen heterozygoten Mutanten eine hochgradig reduzierte fraktionelle Exkretion und signifikant erhöhte Werte der täglichen Exkretion von Harnstoff. Ähnliche Veränderungen wurden bei homozygot mutanten Tieren der Linie *Umod*^{A227T} (KEMTER et al., 2009), sowie bei transgenen Mäusen beschrieben, denen der in der absteigenden Vasa recta lokalisierte UT-B-Harnstofftransporter fehlt (YANG et al., 2002). Dieser ist an der Harnstoffwiederverwertung im medullären Gefäßsystem beteiligt. Harnstoff ist essenziell zur Harnkonzentrierung aufgrund des Gegenstromsystems, an dem die Henlesche Schleife, die Vasa recta und das Sammelrohr beteiligt sind. Es finden sich verschiedene Harnstofftransporter in der Niere, lokalisiert im Sammelrohr, in der absteigenden Vasa recta und im dünnen absteigenden Schenkel der Henleschen Schleife (YANG & BANKIR, 2005). Die Konzentrationsfähigkeit ist ein komplexer Vorgang, der von der Interaktion zwischen NaCl und Harnstoff beeinflusst wird (SANDS, 2003; YANG & BANKIR, 2005; FENTON & KNEPPER, 2007). Einerseits könnte die Resorption von NaCl aufgrund der beeinträchtigten TALH-Funktion behindert sein, andererseits könnte, wie von Kemter et al. (2009) in Erwägung gezogen, aufgrund eines gesteigerten medullären Blutflusses das Gegenstromsystem beeinträchtigt sein, was durch den

verkürzten Kontakt von Harnstoff mit den Nierengefäßwänden zur verringerten fraktionellen Exkretion führt.

Bei heterozygoten Mutanten der Linie HST001 zeigte sich weiterhin eine hochgradige Verringerung der FE von Harnsäure, aber im Gegensatz zur Erkrankung beim Menschen keine Hyperurikämie. Auch bei homozygoten Mutanten der Mauslinie *Umod*^{A227T} wurde eine signifikante Reduktion der FE ohne Hyperurikämie beobachtet (KEMTER et al., 2009). Transgene Mäuse der Linie Tg^{*Umod*C147W} wiesen ebenso keine Hyperurikämie auf (BERNASCONE et al., 2010). Urate (Salze der Harnsäure) werden in den proximalen Tubuli der Niere reabsorbiert. Deren Aufnahme wird von der Natrium-Reabsorption in den proximalen Tubuli angetrieben (CHOI et al., 2005). Es wird vermutet, dass eine verringerte Reabsorption von Natrium im TALH durch erhöhte Aufnahme von Natrium in den proximalen Tubuli kompensiert wird. Die Kopplung der Natrium- mit der Urat-Reabsorption im proximalen Tubulusepithel führt somit zu einer gesteigerten Aufnahme von Urat und einer reduzierten fraktionellen Ausscheidung von Harnsäure (SCOLARI et al., 2004). Mäuse exprimieren in der Leber das Enzym Urikase, das die Oxidation von Harnsäure zu Allantoin katalysiert. Somit ist bei Mäusen bei reduzierter FE von Harnsäure nicht mit einem Anstieg der Plasmaharnsäurewerte zu rechnen. Menschen fehlt das Enzym Urikase (WU et al., 1992; CHOI et al., 2005), so dass es bei verringerter Exkretion von Harnsäure zu Hyperurikämie und der meist daraus folgenden Symptomatik der Gicht kommt (CHOI et al., 2005). Die entsprechenden klinischen Erscheinungen treten in den meisten Fällen bei UAKD des Menschen auf (HART et al., 2002; KUDO et al., 2004; WOLF et al., 2007).

4. Beginn und Progression der Nierenfunktionsstörung

Heterozygote Mutanten der Linie HST001 wiesen einen signifikant erhöhten Plasmaharnstoffwert ab einem Alter von sieben Wochen p.p. auf. Bei homozygoten Mutanten wurde dieser bereits mit einem Lebensalter von zwei Wochen p.p. beobachtet. In der mutanten Mauslinie *Umod*^{A227T} zeigte sich bei heterozygot mutanten Tieren ein signifikant erhöhter Plasmaharnstoffwert erst mit einem Lebensalter von vier Monaten (KEMTER et al., 2009) und bei homozygoten Mutanten ein moderat erhöhter Plasmaharnstoffwert mit sieben Wochen p.p. (Dr. E. Kemter, Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie). Bei der transgenen Mauslinie Tg^{*Umod*C147W} wurde ein erhöhter Plasmawert des Harnstoffes im Lebensalter von 18–21 Wochen festgestellt. Von früheren Messzeitpunkten wurde nicht berichtet (BERNASCONE et al., 2010). Auch in der Reduktion der Uromodulinausscheidung mit dem Harn zeigten heterozygote Mutanten der Linie HST001 im Vergleich zu heterozygot

mutanten Tieren der Linie *Umod*^{A227T} einen stärkeren Phänotyp (KEMTER et al., 2009). Die beiden mutanten Mauslinien HST001 und *Umod*^{A227T} besitzen den gleichen genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes C3H und wurden unter SPF-Bedingungen gehalten. Unterschiede im Beginn und in der Ausprägung des Nierenphänotyps sind somit auf die *Umod*-Mutationen zurückzuführen. Beim Menschen sind die Symptome und der Beginn von UAKD sehr heterogen – sowohl zwischen den Familien als auch bei Patienten mit gleicher *UMOD*-Mutation. Es wurden in vitro-Untersuchungen durchgeführt, um die *UMOD*-Mutationen zu klassifizieren (VYLET'AL et al., 2006; WILLIAMS et al., 2009). So untersuchten Williams et al. (2009) in vitro den Schweregrad der Reifungsstörung von mutantem Uromodulin. Sie teilten die Reifungsstörung in zwei Gruppen ein. Allerdings konnte keine Korrelation zum Schweregrad der klinischen Erkrankung in vivo gezogen werden (WILLIAMS et al., 2009). Gründe für die fehlende Korrelation könnten die genetische Heterogenität beim Menschen und/oder unterschiedliche Ernährung und Umweltbedingungen sein. Somit bietet eine vergleichende Untersuchung der beiden Linien HST001 und *Umod*^{A227T} die Möglichkeit, einer Klassifizierung von *UMOD*-Mutationen im Gesamtorganismus einen Schritt näher zu kommen.

Homozygote Mutanten der Mauslinie HST001 zeigten einen früheren Beginn und eine stärkere Ausprägung der Erkrankung als heterozygote Mutanten. Dies wurde auch bei Patienten mit homozygoter *UMOD*-Mutation festgestellt, bei denen die Erkrankung früher auftrat und einen schnelleren Verlauf bis zum Endstadium der Nierenerkrankung nahm als bei Patienten mit heterozygoter *UMOD*-Mutation (REZENDE-LIMA et al., 2004).

Das relative Nierengewicht heterozygoter und homozygoter Mutanten der Linie HST001 im Alter von zwei Wochen sowie heterozygoter Mutanten 50–51 und 84–99 Wochen p.p. war signifikant erhöht. In der mutanten Mauslinie *Umod*^{A227T} zeigte sich im Lebensalter von vier Monaten ein unverändertes relatives Nierengewicht (KEMTER et al., 2009). Beim Menschen wurde sowohl von reduzierter Nierengröße als auch von normal großen Nieren im Ultraschall berichtet (RAMPOLDI et al., 2003; WOLF et al., 2003; WOLF et al., 2007). Zur Aufklärung der unterschiedlichen Datenlage sind weitere Untersuchungen zu diesem Parameter nötig.

5. Extra-renaler Phänotyp

Heterozygote Mutanten der Linie HST001 waren bis zu den letzten Untersuchungen im Alter von zwei Jahren lebensfähig. Zur Fertilität wurden keine Daten erhoben, doch sie war offensichtlich nicht reduziert. Die homozygoten Mutanten zeigten im Alter von drei Monaten keine offensichtliche vorzeitige Sterberate (keine Daten erhoben). Auch Patienten mit

homozygoter *UMOD*-Mutation können das Erwachsenenalter erreichen (REZENDE-LIMA et al., 2004).

Neben den Veränderungen in der Nierenfunktion wirkte sich die *Umod*-Mutation auf das Körperwachstum der mutanten Tiere der Linie HST001 aus. Bereits ab fünf Wochen p.p. zeigten die mutanten Tiere ein signifikant verringertes Körpergewicht im Vergleich zu den Wildtyptieren. Die mutante Mauslinie *Umod*^{A227T} wies ebenso ein signifikant reduziertes Körpergewicht auf. Das hochgradig reduzierte Körpergewicht der mutanten Mäuse der Linie HST001 wurde bereits zu einem Zeitpunkt offensichtlich, bei dem die Nierenfunktionsstörungen erst begannen, somit scheint diese Veränderung keine Folge von Azotämie und chronischer Niereninsuffizienz zu sein. Adulte heterozygote Mutanten zeigten in den metabolischen und dysmorphologischen Untersuchungen eine erhöhte Futteraufnahme, eine reduzierte Fettmasse, einen reduzierten Fettgehalt sowie einen gesteigerten fettfreien Gehalt. Die Ursachen hierfür müssten in weiteren Untersuchungen analysiert werden. Bei Patienten mit UAKD wurde bisher von keiner Untersuchung diesbezüglich berichtet.

6. Blut und Kreislauf

Bei heterozygoten Mutanten der Linie HST001 wurde 35–36 Wochen p.p. eine mikrozytäre Anämie mit reduzierter Erythrozytenzahl, herabgesetzten Werten von Hämoglobin und Hämatokrit sowie reduzierten Werten für MCV, MCH und RDW festgestellt. Bei 12–13 Wochen alten heterozygoten und homozygoten mutanten Tieren wurde dieses Ergebnis bis auf einzelne veränderte Werte noch nicht festgestellt. Hämatologieparameter können bei der Beurteilung des Fortschreitens einer Nierenerkrankung hilfreich sein, da bei Beeinträchtigung der Nierenfunktion die Erythrozytenzahl aufgrund der beeinträchtigten Erythropoese sinkt (LANG, 2005; SILBERNAGL, 2005).

Die Echokardiographie-Untersuchung zeigte bei adulten heterozygoten Mutanten der Linie HST001 eine Verringerung der linksventrikulären Innendurchmesser in der Systole und Diastole, des linksventrikulären Volumens in der Systole und Diastole sowie der Herzfrequenz ohne weitere Veränderungen der Herzfunktion. Diese Veränderungen korrelieren mit dem reduzierten Körpergewicht der mutanten Tiere.

7. Fazit und Ausblick

Die Linie HST001 stellt neben den bestehenden *Umod*-mutanten Mauslinien ein weiteres Tiermodell für die Uromodulin-assoziierten Nierenerkrankungen des Menschen dar. Es wurden Nierenveränderungen wie herabgesetzte Harnkonzentrierungsfähigkeit mit Polyurie

und reduzierter Harnosmolalität, reduzierte fraktionelle Exkretion von Harnstoff und Harnsäure sowie Hyperkalziurie diagnostiziert. Darüber hinaus wurden als extrarenale Veränderungen, ein reduziertes Körperwachstum und eine veränderte Körperzusammensetzung festgestellt. Diese Veränderungen zeigten sich in analoger Weise auch in der mutanten Mauslinie *Umod*^{A227T}. Ursache hierfür sind „gain-of-toxic-function“-Mutationen des *Umod*-Gens. Da die beiden Linien HST001 und *Umod*^{A227T} denselben genetischen Hintergrund besitzen und sich nur in der *Umod*-Mutation unterscheiden, bieten sich vergleichende Untersuchungen mit den beiden Linien an. Die erhobenen Veränderungen bei Körpergewicht und Energiestoffwechsel zeigen einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen auf, in denen die Wirkung der *Umod*-Mutation auf den Energiestoffwechsel abzuklären ist.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchung zweier ENU-induzierter mutanter Mauslinien mit Fokus auf eine Linie mit einer Punktmutation im Uromodulin-Gen

In dieser Arbeit wurden die zwei ENU-induzierten Mauslinien HST001 und SMA002, die eine dominante Mutation auf dem genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes C3H besitzen, genotypisch und phänotypisch untersucht.

In der Mauslinie SMA002 erbrachte die durchgeführte Feinkartierung der Lage der ursächlichen Mutation im Genom mit weiteren Markern eine Bestätigung der bereits vorliegenden Ergebnisse. Im Bereich der auf Chromosom 13 eingegrenzten Region der ursächlichen Mutation wurden die Kandidatengene *Ntrk2* (58,9 Mb) und *Agtpbp1* (59,6 Mb) zur Sequenzanalyse ausgewählt. Es wurden aber keine Mutationen gefunden. Phänotypische Untersuchungen zeigten die Lebensfähigkeit homozygot mutanter Tiere bei neugeborenen F₂-Hybridtieren mit dem genetischen Hintergrund der C3H- und C57BL/6-Inzuchtstämme. Auch die Zucht eines kongenen Stammes unter Verwendung des Inzuchtstammes C57BL/6 war bis zur Generation N6 erfolgreich.

In der Mauslinie HST001 erbrachte die Kartierung die stärkste Kopplung der ursächlichen Mutation zum polymorphen Mikrosatellitenmarker D7Mit238 bei 126,2 Mb auf Chromosom 7. Nach Auswahl von Uromodulin (*Umod*, 126,6 Mb) als Kandidatengen identifizierte die Sequenzierung der cDNA bei phänotypischen Mutanten eine Punktmutation in Exon 3 von G zu T (nt 278 der translatierten Sequenz). Die Punktmutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Cystein (C) zu Phenylalanin (F) auf Position 93 (*Umod*^{C93F}), der die Ausbildung der Disulfidbrücke C93-C105 verhindert. Die ursächliche Mutation C93F liegt in einer hochkonservierten Region innerhalb der Kalzium-bindenden EGF-ähnlichen Domäne II des Uromodulin-Proteins. Die phänotypische Untersuchung adulter heterozygot mutanter Mäuse der Linie HST001 ergab eine Azotämie, eine signifikant beeinträchtigte Harnkonzentrierungsfähigkeit mit Polyurie, Polydipsie und einer signifikant verringerten Harnosmolalität, eine hochgradig reduzierte fraktionelle Ausscheidung von Harnsäure, eine verringerte fraktionelle Exkretion von Harnstoff und eine Hyperkalziurie. Die Uromodulinausscheidung mit dem Harn war stark reduziert. Eine signifikante Erhöhung des Plasmaharnstoffwertes zeigten heterozygote Mutanten ab dem Untersuchungszeitpunkt sieben Wochen p.p. und homozygot mutante Tiere ab zwei Wochen p.p.. Adulte heterozygot mutante Tiere der Linie HST001 zeigten eine Osteopenie. Zusätzlich wiesen heterozygote Mutanten

trotz erhöhter absoluter Futteraufnahme ein signifikant reduziertes Körpergewicht und einen stark verringerten Körperfettgehalt auf. Zusammenfassend führt die *Umod*-Mutation zu einer Funktionsstörung des dicken aufsteigenden Schenkels der Henleschen Schleife (TALH).

Somit stellt die mutante Mauslinie HST001 ein Tiermodell für Uromodulin-assoziierte Nierenerkrankungen (UAKD) beim Menschen dar, welche durch Hyperurikämie, Gicht, Beeinträchtigung der Harnkonzentrierungsfähigkeit, progressives Nierenversagen und pathologische Veränderungen der Nieren wie tubulointerstitielle Nephritis, Zysten und interstitielle Fibrose charakterisiert sind. Die weitere Untersuchung der mutanten Mauslinie HST001 kann einen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese von UAKD leisten.

VII. SUMMARY

Analysis of two ENU-induced mutant mouse lines with focus on a line displaying a point mutation in the uromodulin gene

The thesis describes the genotypic and phenotypic analysis of the two ENU-induced mutant mouse lines HST001 and SMA002, each harboring a dominant mutation on the genetic background of C3H inbred mice.

In line SMA002, fine mapping of the chromosomal site of the causative mutation with additional markers confirmed the previous results. The candidate genes *Ntrk2* (58.9 Mb) and *Agtpbp1* (59.6 Mb) which are located in the mapped region on chromosome 13, were chosen for sequence analysis, however, no mutation was found. Phenotypic analyses revealed the viability of homozygous mutant animals in newborn F2 hybrids on the genetic background of C3H and C57BL/6 mice. In addition, breeding of a congenic strain by using C57BL/6 inbred mice was successfully carried to generation N6.

In line HST001, mapping analysis showed the strongest linkage of the causative mutation to the polymorphic microsatellite marker D7Mit238 at 126.2 Mb on chromosome 7. After having selected uromodulin (*Umod*, 126.6 Mb) as candidate gene, sequencing of phenotypic mutants revealed a G to T point mutation in exon 3 (nt 278 of the translated sequence). The point mutation leads to an amino acid substitution of cysteine (C) to phenylalanine (F) at position 93 which inhibits the generation of the disulfide bond C93-C105. The causative mutation C93F is located in a well-conserved region within the second calcium-binding, epidermal growth factor-like domain of the uromodulin protein. The phenotypic analysis of adult heterozygous mutant mice of line HST001 revealed azotemia, significantly impaired urine concentration ability with polyuria, polydipsia and significantly lowered urine osmolality, highly reduced fractional excretion of uric acid, lowered fractional excretion of urea as well as hypercalciuria. Urinary uromodulin excretion was severely reduced. Heterozygous mutants displayed a significant increase in plasma urea levels as early as seven weeks p.p. and homozygous mutant animals two weeks p.p. Adult heterozygous mutant mice showed strong osteopenia. In addition, despite increased food intake, heterozygous mutants showed significantly reduced body weight and severely decreased fat content. Taken together, the *Umod* mutation results in the dysfunction of the thick ascending limb of Henle's loop (TALH).

Thus, the mutant mouse line HST001 represents an animal model for human uromodulin-associated kidney diseases (UAKD) which are characterized by hyperuricemia, gout, alteration of urine concentrating ability, progressive renal failure and pathologic alterations of the kidney such as tubulointerstitial nephritis, cysts and interstitial fibrosis. Ongoing analysis of the line HST001 may provide novel insights in the pathogenesis of UAKD.

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Durchgeführte ENU-Mausmutageneseprojekte (modifiziert nach HRABE DE ANGELIS et al., 2007).....	4
Tabelle 2: ENU-induzierte Mausmodelle mit veränderter Nierenfunktion als Hauptsymptom zur Linienetablierung.....	9
Tabelle 3: Zur Grobkartierung verwendete SNPs und ihre Lokalisation	39
Tabelle 4: Zur Feinkartierung auf Chromosom 7 ausgewählte Mikrosatelliten.....	41
Tabelle 5: Zur Feinkartierung auf Chromosom 13 ausgewählte polymorphe DNA-Marker ..	41
Tabelle 6: Primerpaare zur Sequenzanalyse von <i>Umod</i>	43
Tabelle 7: Primerpaare zur Sequenzanalyse von <i>Ntrk2</i>	44
Tabelle 8: Primerpaare zur Sequenzanalyse von <i>Agtpbp1</i>	45
Tabelle 9: Morphologische Untersuchung der Linie HST001.....	47
Tabelle 10: Phänotypdaten der N2-Rückkreuzungstiere für die Kopplungsanalyse der Linie HST001	50
Tabelle 11: Kopplungsanalyse der Linie HST001.....	51
Tabelle 12: Feinkartierung mit phänotypisch heterozygoten Mutanten der Linie HST001	54
Tabelle 13: Feinkartierung mit phänotypischen Wildtyptieren der Linie HST001	54
Tabelle 14: Nachkommen heterozygoter Mutanten der Linie HST001	58
Tabelle 15: Phänotypuntersuchungen in der Linie HST001.....	59
Tabelle 16: Erstellung von phänotypischen Mutanten und Wildtyptieren	60
Tabelle 17: Morphologiedaten von 2 Wochen alten Mäusen.....	61
Tabelle 18: Morphologiedaten von 35–36 Wochen alten Mäusen.....	62
Tabelle 19: Morphologie- und Stoffwechseldaten von 39–42 Wochen alten Mäusen.....	63
Tabelle 20: Morphologiedaten von 50–51 Wochen alten Mäusen.....	66
Tabelle 21: Morphologiedaten von 84–99 Wochen alten Mäusen.....	68
Tabelle 22: Körpergewichtsentwicklung der Linie HST001 bis 20 Wochen p.p.....	70
Tabelle 23: Blutplasmadaten von 2 Wochen alten Mäusen.....	73
Tabelle 24: Blutplasmadaten von 4 Wochen alten Mäusen.....	75
Tabelle 25: Blutplasmadaten von 7 Wochen alten Mäusen.....	77
Tabelle 26: Blutplasmadaten von 12–13 Wochen alten Mäusen.....	79
Tabelle 27: Hämatologiedaten von 12–13 Wochen alten Mäusen	80
Tabelle 28: Blutplasmadaten von 35–36 Wochen alten Mäusen.....	82
Tabelle 29: Blutplasmadaten von 36–37 Wochen alten Mäusen (mit Futterentzug)	83

Tabelle 30: Hämatologiedaten von 35–36 Wochen alten Mäusen	84
Tabelle 31: Blutplasmadaten von 84–99 Wochen alten Mäusen.....	85
Tabelle 32: Harndaten von 39–42 Wochen alten Mäusen im Stoffwechsellkäfig.....	91
Tabelle 33: Kreatinin-Clearance, U/P-Verhältnis und FE von 39–42 Wochen alten Mäusen .	92
Tabelle 34: Harndaten von 39–42 Wochen alten Mäusen nach Wasserentzug für 18 Stunden.....	95
Tabelle 35: DXA-Analyse von 35–36 Wochen alten Mäusen	97
Tabelle 36: Echokardiographie- und Nt-proANP-Daten von 35–38 Wochen alten Mäusen ...	99
Tabelle 37: SNP-Marker auf Chromosom 13 ohne Polymorphismus in C3H und C57BL/6	102
Tabelle 38: Feinkartierung mit phänotypischen heterozygoten Mutanten der Linie SMA002	103
Tabelle 39: Feinkartierung mit phänotypischen Wildtyptieren der Linie SMA002.....	103
Tabelle 40: Feinkartierung bei phänotypischen heterozygoten Mutanten ohne kontinuierlichen heterozygoten Genotyp im untersuchten Genombereich	104
Tabelle 41: Genotypdaten aus Anpaarungen von heterozygot mutanten F1-Hybridtieren	107

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau des Nephrons mit Sammelrohr (abgeändert aus SILBERNAGL, 2010)	12
Abbildung 2: Struktur von Uromodulin (THP) (aus SERAFINI-CESSI et al., 2003).....	15
Abbildung 3: Ionenkanäle und Ionenbewegungen an einer Tubuluszelle im TALH (abgeändert aus GIEBISCH, 2001).....	16
Abbildung 4: Lokalisation von DNA-Markern und Kandidatengen auf Chromosom 7.....	53
Abbildung 5: Analyse von Umod in der Linie HST001	57
Abbildung 6: Körpergewicht, Körpergewichtsverlust und Futteraufnahme von 39–42 Wochen alten Mäusen	64
Abbildung 7: Körpergewichtsunterschied von 56 Wochen alten Mäusen	67
Abbildung 8: Körpergewichtsentwicklung bis zu 20 Wochen p.p.....	71
Abbildung 9: Plasmaharnstoff von 2 Wochen alten Mäusen	74
Abbildung 10: Verlauf ausgewählter Blutparameter	89
Abbildung 11: Ausgewählte Nierenfunktionsparameter von 39–42 Wochen alten Mäusen	94
Abbildung 12: Westernblot-Analyse des Uromodulins im Urin von 39–42 Wochen alten Mäusen	96
Abbildung 13: Wachstumsdefizit und Kratzverhalten der Mauslinie SMA002	100
Abbildung 14: Lokalisation der DNA-Marker zur Feinkartierung auf Chromosom 13 und der Kandidatengene der Linie SMA002	102
Abbildung 15: Transkripte des Kandidatengens <i>Ntrk2</i> mit den zur Sequenzanalyse verwendeten Primerpaaren.....	105
Abbildung 16: Transkripte des Kandidatengens <i>Agtpbp1</i> mit den zur Sequenzanalyse verwendeten Primerpaaren.....	106
Abbildung 17: Erstellung eines kongenen Stammes der Linie SMA002.....	108

X. LITERATURVERZEICHNIS

Aigner B, Rathkolb B, Herbach N, Kemter E, Schessl C, Klasten M, Klempt M, de Angelis MH, Wanke R, Wolf E. Screening for increased plasma urea levels in a large-scale ENU mouse mutagenesis project reveals kidney disease models. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F1560-7.

Bachmann S, Metzger R, Bunnemann B. Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney. *Histochemistry* 1990; 94: 517-23.

Bachmann S, Mutig K, Bates J, Welker P, Geist B, Gross V, Luft FC, Alenina N, Bader M, Thiele BJ, Prasad K, Raffi HS, Kumar S. Renal effects of Tamm-Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F559-67.

Barbaric I, Wells S, Russ A, Dear TN. Spectrum of ENU-induced mutations in phenotype-driven and gene-driven screens in the mouse. *Environ Mol Mutagen* 2007; 48: 124-42.

Bates JM, Raffi HM, Prasad K, Mascarenhas R, Laszik Z, Maeda N, Hultgren SJ, Kumar S. Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection: rapid communication. *Kidney Int* 2004; 65: 791-7.

Benetti E, Caridi G, Vella MD, Rampoldi L, Ghiggeri GM, Artifoni L, Murer L. Immature renal structures associated with a novel UMOD sequence variant. *Am J Kidney Dis* 2009; 53: 327-31.

Bernascone I, Vavassori S, Di Pentima A, Santambrogio S, Lamorte G, Amoroso A, Scolari F, Ghiggeri GM, Casari G, Polishchuk R, Rampoldi L. Defective intracellular trafficking of uromodulin mutant isoforms. *Traffic* 2006; 7: 1567-79.

Bernascone I, Janas S, Ikehata M, Trudu M, Corbelli A, Schaeffer C, Rastaldi MP, Devuyst O, Rampoldi L. A transgenic mouse model for uromodulin-associated kidney diseases shows specific tubulo-interstitial damage, urinary concentrating defect and renal failure. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 2998-3010.

Bingham C, Bulman MP, Ellard S, Allen LI, Lipkin GW, Hoff WG, Woolf AS, Rizzoni G, Novelli G, Nicholls AJ, Hattersley AT. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 219-24.

Bleyer AJ, Trachtman H, Sandhu J, Gorry MC, Hart TC. Renal manifestations of a mutation in the uromodulin (Tamm Horsfall protein) gene. *Am J Kidney Dis* 2003a; 42: E20-6.

Bleyer AJ, Woodard AS, Shihabi Z, Sandhu J, Zhu H, Satko SG, Weller N, Deterding E, McBride D, Gorry MC, Xu L, Ganier D, Hart TC. Clinical characterization of a family with a mutation in the uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein) gene. *Kidney Int* 2003b; 64: 36-42.

Bleyer AJ, Hart TC, Shihabi Z, Robins V, Hoyer JR. Mutations in the uromodulin gene decrease urinary excretion of Tamm-Horsfall protein. *Kidney Int* 2004; 66: 974-7.

Brown SD, Peters J. Combining mutagenesis and genomics in the mouse--closing the phenotype gap. *Trends Genet* 1996; 12: 433-5.

Brown SD, Balling R. Systematic approaches to mouse mutagenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 268-73.

Burg MB. Thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int* 1982; 22: 454-64.

Calado J, Gaspar A, Clemente C, Rueff J. A novel heterozygous missense mutation in the UMOD gene responsible for Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy. *BMC Med Genet* 2005; 6: 5.

Charles DJ, Pretsch W. Linear dose-response relationship of erythrocyte enzyme-activity mutations in offspring of ethylnitrosourea-treated mice. *Mutat Res* 1987; 176: 81-91.

Chen WC, Lin HS, Tsai FJ, Li CW. Effects of Tamm-Horsfall protein and albumin on the inhibition of free radicals. *Urol Int* 2001a; 67: 305-9.

Chen WC, Lin HS, Chen HY, Shih CH, Li CW. Effects of Tamm-Horsfall protein and albumin on calcium oxalate crystallization and importance of sialic acids. *Mol Urol* 2001b; 5: 1-5.

Choi HK, Mount DB, Reginato AM. Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med* 2005; 143: 499-516.

Coe FL, Parks JH, Asplin JR. The pathogenesis and treatment of kidney stones. *N Engl J Med* 1992; 327: 1141-52.

Cordes SP. N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis: boarding the mouse mutant express. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69: 426-39.

Dahan K, Fuchshuber A, Adamis S, Smaers M, Kroiss S, Loute G, Cosyns JP, Hildebrandt F, Verellen-Dumoulin C, Pirson Y. Familial juvenile hyperuricemic nephropathy and autosomal dominant medullary cystic kidney disease type 2: two facets of the same disease? *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2348-57.

Dahan K, Devuyst O, Smaers M, Vertommen D, Loute G, Poux JM, Viron B, Jacquot C, Gagnadoux MF, Chauveau D, Buchler M, Cochat P, Cosyns JP, Mougnot B, Rider MH, Antignac C, Verellen-Dumoulin C, Pirson Y. A cluster of mutations in the UMOD gene causes familial juvenile hyperuricemic nephropathy with abnormal expression of uromodulin. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2883-93.

Doering DC, Borowicz JL, Crockett ET. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin Pathol* 2003; 3: 3.

El-Achkar TM, Wu XR, Rauchman M, McCracken R, Kiefer S, Dagher PC. Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TLR4 expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F534-44.

Fenton RA, Knepper MA. Urea and renal function in the 21st century: insights from knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 679-88.

Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med* 2002; 113 Suppl 1A: 5S-13S.

Fuchs H, Lisse T, Abe K, Hrabe de Angelis M. Screening for bone and cartilage phenotypes in mice. In: Phenotyping of the Laboratory Mouse. Hrabe de Angelis M, Chambon P, Browns S, eds. Weinheim: Wiley-VCH 2006: 35-86.

Fuchs H, Gailus-Durner V, Adler T, Aguilar-Pimentel JA, Becker L, Calzada-Wack J, Da Silva-Buttkus P, Neff F, Gotz A, Hans W, Holter SM, Horsch M, Kastenmuller G, Kemter E, Lengger C, Maier H, Matloka M, Moller G, Naton B, Prehn C, Puk O, Racz I, Rathkolb B, Romisch-Margl W, Rozman J, Wang-Sattler R, Schrewe A, Stoger C, Tost M, Adamski J, Aigner B, Beckers J, Behrendt H, Busch DH, Esposito I, Graw J, Illig T, Ivandic B, Klingenspor M, Klopstock T, Kremmer E, Mempe M, Neschen S, Ollert M, Schulz H, Suhre K, Wolf E, Wurst W, Zimmer A, Hrabe de Angelis M. Mouse phenotyping. *Methods* 2011; 53: 120-35

Gamba G. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev* 2005; 85: 423-93.

Giebisch G. Renal potassium channels: function, regulation, and structure. *Kidney Int* 2001; 60: 436-45.

Grant AM, Neuberger A. The development of a radioimmunoassay for the measurement of urinary Tamm-Horsfall glycoprotein in the presence of sodium dodecyl sulphate. *Clin Sci* 1973; 44: 163-79.

Greger R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 1985; 65: 760-97.

Gusmano R, Caridi G, Marini M, Perfumo F, Ghiggeri GM, Piaggio G, Ceccherini I, Seri M. Glomerulocystic kidney disease in a family. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 813-8.

Hart TC, Gorry MC, Hart PS, Woodard AS, Shihabi Z, Sandhu J, Shirts B, Xu L, Zhu H, Barmada MM, Bleyer AJ. Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J Med Genet* 2002; 39: 882-92.

Herron BJ, Lu W, Rao C, Liu S, Peters H, Bronson RT, Justice MJ, McDonald JD, Beier DR. Efficient generation and mapping of recessive developmental mutations using ENU mutagenesis. *Nat Genet* 2002; 30: 185-9.

Hess B, Nakagawa Y, Coe FL. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *Am J Physiol* 1989; 257: F99-106.

Hess B, Nakagawa Y, Parks JH, Coe FL. Molecular abnormality of Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate nephrolithiasis. *Am J Physiol* 1991; 260: F569-78.

Hession C, Decker JM, Sherblom AP, Kumar S, Yue CC, Mattaliano RJ, Tizard R, Kawashima E, Schmeissner U, Heletky S, et al. Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein): a renal ligand for lymphokines. *Science* 1987; 237: 1479-84.

Hildebrandt F, Otto E. Cilia and centrosomes: a unifying pathogenic concept for cystic kidney disease? *Nat Rev Genet* 2005; 6: 928-40.

Hitotsumachi S, Carpenter DA, Russell WL. Dose-repetition increases the mutagenic effectiveness of N-ethyl-N-nitrosourea in mouse spermatogonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 6619-21.

Hoelter SM, Dalke C, Kallnik M, Becker L, Horsch M, Schrewe A, Favor J, Klopstock T, Beckers J, Ivandic B, Gailus-Durner V, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Graw J, Wurst W. "Sighted C3H" mice--a tool for analysing the influence of vision on mouse behaviour? *Front Biosci* 2008; 13: 5810-23.

Howaldt MS (2004). Phänotypische und genotypische Charakterisierung der ENU-induzierten Mausmutante SMA002 als Tiermodell für Wachstumsdefizit und Hyperaktivität. In: Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Hrabe de Angelis M, Michel D, Wagner S, Becker S, Beckers J. Chemical Mutagenesis in Mice. In: *The mouse in biomedical research - v.1. History, wild mice, and genetics*, 2nd edn. Fox JG, Barthold SW, Davisson MT, Newcomer CE, Quimby FW, Smith AL, eds. Burlington, MA: Academic Press 2007: 225-60.

Hrabe de Angelis MH, Flaswinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D, Marschall S, Heffner S, Pargent W, Wuensch K, Jung M, Reis A, Richter T, Alessandrini F, Jakob T, Fuchs E, Kolb H, Kremmer E, Schaeble K, Rollinski B, Roscher A, Peters C, Meitinger T, Strom T, Steckler T, Holsboer F, Klopstock T, Gekeler F, Schindewolf C, Jung T, Avraham K, Behrendt H, Ring J, Zimmer A, Schughart K, Pfeffer K, Wolf E, Balling R. Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet* 2000; 25: 444-7.

Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarman PM. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 457-61.

Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS, Zheng B, Bradley A. Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1955-63.

Keays DA, Clark TG, Campbell TG, Broxholme J, Valdar W. Estimating the number of coding mutations in genotypic and phenotypic driven N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) screens: revisited. *Mamm Genome* 2007; 18: 123-4.

Kemter E, Rathkolb B, Rozman J, Hans W, Schrewe A, Landbrecht C, Klaften M, Ivandic BT, Fuchs HN, Gailus-Durner V, Klingenspor M, Hrabe de Angelis M, Wolf E, Wanke R, Aigner B. Novel Missense Mutation of Uromodulin in Mice Causes Renal Dysfunction with Alterations in Urea Handling, Energy and Bone Metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297: F1391-8.

Kemter E, Rathkolb B, Bankir L, Schrewe A, Hans W, Landbrecht C, Klaften M, Ivandic B, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabe de Angelis M, Wolf E, Wanke R, Aigner B. Mutation of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC2 in mice is associated with severe polyuria and a urea-selective concentrating defect without hyperreninemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298: F1405-15.

Klaften M, Hrabe de Angelis M. ARTS: a web-based tool for the set-up of high-throughput genome-wide mapping panels for the SNP genotyping of mouse mutants. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: W496-500.

Klose R, Kemter E, Bedke T, Bittmann I, Kelsser B, Endres R, Pfeffer K, Schwinzer R, Wolf E. Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs. *Transplantation* 2005; 80: 222-30.

Kotanko P, Gebetsroither E, Skrabal F. Familial juvenile hyperuricaemic nephropathy in a Caucasian family associated with inborn malformations. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1333-5.

Kudo E, Kamatani N, Tezuka O, Taniguchi A, Yamanaka H, Yabe S, Osabe D, Shinohara S, Nomura K, Segawa M, Miyamoto T, Moritani M, Kunika K, Itakura M. Familial juvenile hyperuricemic nephropathy: detection of mutations in the uromodulin gene in five Japanese families. *Kidney Int* 2004; 65: 1589-97.

Lang F. Niere, Salz-Wasser-Haushalt. In: Taschenatlas der Pathophysiologie, 2. edn. Silbernagl S, Lang F, eds. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2005: 92-133.

Langermann S, Palaszynski S, Barnhart M, Auguste G, Pinkner JS, Burlein J, Barren P, Koenig S, Leath S, Jones CH, Hultgren SJ. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* 1997; 276: 607-11.

Lhotta K, Gehringer A, Jennings P, Kronenberg F, Brezinka C, Andersone I, Strazdins V. Familial juvenile hyperuricemic nephropathy: report on a new mutation and a pregnancy. *Clin Nephrol* 2009; 71: 80-3.

Lloyd DJ, Hall FW, Tarantino LM, Gekakis N. Diabetes insipidus in mice with a mutation in aquaporin-2. *PLoS Genet* 2005; 1: e20.

Mo L, Zhu XH, Huang HY, Shapiro E, Hasty DL, Wu XR. Ablation of the Tamm-Horsfall protein gene increases susceptibility of mice to bladder colonization by type 1-fimbriated *Escherichia coli*. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004a; 286: F795-802.

Mo L, Huang HY, Zhu XH, Shapiro E, Hasty DL, Wu XR. Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int* 2004b; 66: 1159-66.

Mo L, Liaw L, Evan AP, Sommer AJ, Lieske JC, Wu XR. Renal calcinosis and stone formation in mice lacking osteopontin, Tamm-Horsfall protein, or both. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293: F1935-43.

Moran JL, Bolton AD, Tran PV, Brown A, Dwyer ND, Manning DK, Bjork BC, Li C, Montgomery K, Siepka SM, Vitaterna MH, Takahashi JS, Wiltshire T, Kwiatkowski DJ, Kucherlapati R, Beier DR. Utilization of a whole genome SNP panel for efficient genetic mapping in the mouse. *Genome Res* 2006; 16: 436-40.

Muchmore AV, Decker JM. Uromodulin: a unique 85-kilodalton immunosuppressive glycoprotein isolated from urine of pregnant women. *Science* 1985; 229: 479-81.

Muchmore AV, Shifrin S, Decker JM. In vitro evidence that carbohydrate moieties derived from uromodulin, an 85,000 dalton immunosuppressive glycoprotein isolated from human pregnancy urine, are immunosuppressive in the absence of intact protein. *J Immunol* 1987; 138: 2547-53.

Mulvey MA. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 2002; 4: 257-71.

Nasr SH, Lucia JP, Galgano SJ, Markowitz GS, D'Agati VD. Uromodulin storage disease. *Kidney Int* 2008; 73: 971-6.

Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 2002; 36: 20-42.

Pak J, Pu Y, Zhang ZT, Hasty DL, Wu XR. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *J Biol Chem* 2001; 276: 9924-30.

Pennica D, Kohr WJ, Kuang WJ, Glaister D, Aggarwal BB, Chen EY, Goeddel DV. Identification of human uromodulin as the Tamm-Horsfall urinary glycoprotein. *Science* 1987; 236: 83-8.

Peters T, Thaete C, Wolf S, Popp A, Sedlmeier R, Grosse J, Nehls MC, Russ A, Schlueter V. A mouse model for cystinuria type I. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2109-20.

Petkov PM, Ding Y, Cassell MA, Zhang W, Wagner G, Sargent EE, Asquith S, Crew V, Johnson KA, Robinson P, Scott VE, Wiles MV. An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships. *Genome Res* 2004a; 14: 1806-11.

Petkov PM, Cassell MA, Sargent EE, Donnelly CJ, Robinson P, Crew V, Asquith S, Haar RV, Wiles MV. Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomics* 2004b; 83: 902-11.

Rampoldi L, Caridi G, Santon D, Boaretto F, Bernascone I, Lamorte G, Tardanico R, Dagnino M, Colussi G, Scolari F, Ghiggeri GM, Amoroso A, Casari G. Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 3369-84.

Rathkolb B, Fuchs E, Kolb HJ, Renner-Muller I, Krebs O, Balling R, Hrabe de Angelis M, Wolf E. Large-scale N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis of mice--from phenotypes to genes. *Exp Physiol* 2000; 85: 635-44.

Rezende-Lima W, Parreira KS, Garcia-Gonzalez M, Riveira E, Banet JF, Lens XM. Homozygosity for uromodulin disorders: FJHN and MCKD-type 2. *Kidney Int* 2004; 66: 558-63.

Rindler MJ, Naik SS, Li N, Hoops TC, Peraldi MN. Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein/uromucoid) is a phosphatidylinositol-linked membrane protein. *J Biol Chem* 1990; 265: 20784-9.

Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome* 1997; 8: 711-3.

Russ A, Stumm G, Augustin M, Sedlmeier R, Wattler S, Nehls M. Random mutagenesis in the mouse as a tool in drug discovery. *Drug Discov Today* 2002; 7: 1175-83.

Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC, Phipps EL. Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 5818-9.

Russell WL, Hunsicker PR, Raymer GD, Steele MH, Stelzner KF, Thompson HM. Dose--response curve for ethylnitrosourea-induced specific-locus mutations in mouse spermatogonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 3589-91.

Saemann MD, Weichhart T, Zeyda M, Staffler G, Schunn M, Stuhlmeier KM, Sobanov Y, Stulnig TM, Akira S, von Gabain A, von Ahsen U, Horl WH, Zlabinger GJ. Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2005; 115: 468-75.

Sands JM. Mammalian urea transporters. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 543-66.

Schaffer P, Gombos E, Meichelbeck K, Kiss A, Hart PS, Bleyer AJ. Childhood course of renal insufficiency in a family with a uromodulin gene mutation. *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 1355-60.

Scolari F, Caridi G, Rampoldi L, Tardanico R, Izzi C, Pirulli D, Amoroso A, Casari G, Ghiggeri GM. Uromodulin storage diseases: clinical aspects and mechanisms. *Am J Kidney Dis* 2004; 44: 987-99.

Serafini-Cessi F, Malagolini N, Dall'Olio F. A tetraantennary glycopeptide from human Tamm-Horsfall glycoprotein inhibits agglutination of desialylated erythrocytes induced by leucoagglutinin. *Biosci Rep* 1984; 4: 973-8.

Serafini-Cessi F, Malagolini N, Cavallone D. Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 658-76.

Sharp CK, Bergman SM, Stockwin JM, Robbin ML, Galliani C, Guay-Woodford LM. Dominantly transmitted glomerulocystic kidney disease: a distinct genetic entity. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 77-84.

Shedlovsky A, McDonald JD, Symula D, Dove WF. Mouse models of human phenylketonuria. *Genetics* 1993; 134: 1205-10.

Sherblom AP, Decker JM, Muchmore AV. The lectin-like interaction between recombinant tumor necrosis factor and uromodulin. *J Biol Chem* 1988; 263: 5418-24.

Shibuya T, Morimoto K. A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mutat Res* 1993; 297: 3-38.

Silbernagl S. Blut. In: Taschenatlas der Pathophysiologie, 2. edn. Silbernagl S, Lang F, eds. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2005: 28-65.

Silbernagl S. Die Funktion der Nieren. In: Physiologie, 6. edn. Klinke R, Pape H, Kurtz A, Silbernagl S, eds. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2010: 329-82.

Silver LM. *Mouse Genetics: Concepts and Applications*. New York: Oxford University Press 1995.

Sinowatz F. Harnorgane. In: *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*, 3. edn. Hees H, Sinowatz F, eds. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag 2000: 285-302.

Soewarto D, Fella C, Teubner A, Rathkolb B, Pargent W, Heffner S, Marschall S, Wolf E, Balling R, Hrabe de Angelis M. The large-scale Munich ENU-mouse-mutagenesis screen. *Mamm Genome* 2000; 11: 507-10.

Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 756-68.

Takahasi KR, Sakuraba Y, Gondo Y. Mutational pattern and frequency of induced nucleotide changes in mouse ENU mutagenesis. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 52.

Takiue Y, Hosoyamada M, Yokoo T, Kimura M, Shibasaki T. Progressive accumulation of intrinsic mouse uromodulin in the kidneys of transgenic mice harboring the mutant human uromodulin gene. *Biol Pharm Bull* 2008a; 31: 405-11.

Takiue Y, Hosoyamada M, Yokoo T, Kimura M, Ochiai M, Kaneko K, Ichida K, Hosoya T, Shibasaki T. Production and characterization of transgenic mice harboring mutant human UMOD gene. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008b; 27: 596-600.

Tamm I, Horsfall FL, Jr. Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950; 74: 106-8.

Tamm I, Horsfall FL, Jr. A mucoprotein derived from human urine which reacts with influenza, mumps, and Newcastle disease viruses. *J Exp Med* 1952; 95: 71-97.

Tran vT (2004). Phänotypische und genotypische Charakterisierung der ENU-induzierten Mausmutante HST001 zur Verwendung für die nephrologische Forschung. In: Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Turner JJ, Stacey JM, Harding B, Kotanko P, Lhotta K, Puig JG, Roberts I, Torres RJ, Thakker RV. UROMODULIN mutations cause familial juvenile hyperuricemic nephropathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1398-401.

Vollmerhaus B. Harnorgane, Organa urinaria. In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere - Bd. II Eingeweide, 8. edn. Frewein J, Gasse H, Leiser R, Roos H, Thomé H, Vollmerhaus B, Waibl H, eds. Berlin: Parey Buchverlag 1999: 309-40.

Vylet'al P, Kublova M, Kalbacova M, Hodanova K, Baresova V, Stiburkova B, Sikora J, Hulkova H, Zivny J, Majewski J, Simmonds A, Fryns JP, Venkat-Raman G, Elleder M, Kmoch S. Alterations of uromodulin biology: a common denominator of the genetically heterogeneous FJHN/MCKD syndrome. *Kidney Int* 2006; 70: 1155-69.

Wang W, Hebert SC, Giebisch G. Renal K⁺ channels: structure and function. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 413-36.

Weiss E. Harnorgane. In: Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, 5. edn. Dahme E, Weiss E, eds. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag 1999: 243-77.

Welker P, Geist B, Fruhauf JH, Salanova M, Groneberg DA, Krause E, Bachmann S. Role of lipid rafts in membrane delivery of renal epithelial Na⁺-K⁺-ATPase, thick ascending limb. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: R1328-37.

Welker P, Bohlick A, Mutig K, Salanova M, Kahl T, Schluter H, Blottner D, Ponce-Coria J, Gamba G, Bachmann S. Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F789-802.

Wesson JA, Worcester EM, Wiessner JH, Mandel NS, Kleinman JG. Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules. *Kidney Int* 1998; 53: 952-7.

Williams SE, Reed AA, Galvanovskis J, Antignac C, Goodship T, Karet FE, Kotanko P, Lhotta K, Moriniere V, Williams P, Wong W, Rorsman P, Thakker RV. Uromodulin mutations causing familial juvenile hyperuricaemic nephropathy lead to protein maturation defects and retention in the endoplasmic reticulum. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 2963-74.

Wolf MT, Mucha BE, Attanasio M, Zalewski I, Karle SM, Neumann HP, Rahman N, Bader B, Baldamus CA, Otto E, Witzgall R, Fuchshuber A, Hildebrandt F. Mutations of the Uromodulin gene in MCKD type 2 patients cluster in exon 4, which encodes three EGF-like domains. *Kidney Int* 2003; 64: 1580-7.

Wolf MT, Beck BB, Zaucke F, Kunze A, Misselwitz J, Ruley J, Ronda T, Fischer A, Eifinger F, Licht C, Otto E, Hoppe B, Hildebrandt F. The Uromodulin C744G mutation causes MCKD2 and FJHN in children and adults and may be due to a possible founder effect. *Kidney Int* 2007; 71: 574-81.

Wolf MT, Hoskins BE, Beck BB, Hoppe B, Tasic V, Otto EA, Hildebrandt F. Mutation analysis of the Uromodulin gene in 96 individuals with urinary tract anomalies (CAKUT). *Pediatr Nephrol* 2009; 24: 55-60.

Worcester EM. Urinary calcium oxalate crystal growth inhibitors. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: S46-53.

Wu XW, Muzny DM, Lee CC, Caskey CT. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol* 1992; 34: 78-84.

Yang B, Bankir L, Gillespie A, Epstein CJ, Verkman AS. Urea-selective concentrating defect in transgenic mice lacking urea transporter UT-B. *J Biol Chem* 2002; 277: 10633-7.

Yang B, Bankir L. Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F881-96.

Zalc B, Collet A, Monge M, Ollier-Hartmann MP, Jacque C, Hartmann L, Baumann NA. Tamm-Horsfall protein, a kidney marker is expressed on brain sulfogalactosylceramide-positive astroglial structures. *Brain Res* 1984; 291: 182-7.

Zaucke F, Boehnlein JM, Steffens S, Polishchuk RS, Rampoldi L, Fischer A, Pasch A, Boehm CW, Baasner A, Attanasio M, Hoppe B, Hopfer H, Beck BB, Sayer JA, Hildebrandt F, Wolf MT. Uromodulin is expressed in renal primary cilia and UMOD mutations result in decreased ciliary uromodulin expression. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 1985-97.

XI. ANHANG

1. Material

Geräte

ABC Animal Blood Counter (scil Vetabc TM)	Scil, Viernheim
Brutschrank (Modell 100-800)	Memmert, Schwabach
Digitales Mikro-Osmometer (Typ 5B)	Roebbling, Berlin
Elektrophoresekammer, horizontal	MWG-Biotech, Ebersberg
Geldokumentationssystem	Bio-Rad, München
Geschlitten	OwI Separation Systems, Porthmouth, Niederlande
Gewebe-Homogenisator (ART-Mirco D 8)	ART Labortechnik, Müllheim
Magnetrührer mit Heizplatte (RH basic)	IKA Labortechnik, Staufen
Microprocessor pH Meter (pH 96)	WTW, Weilheim
Mikrowelle	Severin, Sundern
<u>Mikrozentrifugen:</u>	
Biofuge pico	Heraeus, Osterode
5415D	Eppendorf, Hamburg
5417R mit Kühlung	Eppendorf, Hamburg
MS1 Minishaker	IKA – Works, Wilmington, USA
Pipetten (Pipetman [®] P)	Gilson S.A.S., Villiers-le-Bel, Frankreich
(1000, 200, 100, 20, 10, 2 µl)	
<u>Power Supplies:</u>	
Power Pac 300	Bio-Rad, München
Power Station 300	LabNet, Ried im Innkreis
<u>Spektralphotometer:</u>	
Beckmann	Beckmann, Palo Alto, CA, USA
GeneQuant pro	Amersham Biosciences, Freiburg
<u>Thermocycler:</u>	
GeneAmp [®] PCR System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Mastercycler [®] gradient	Eppendorf, Hamburg
<u>Thermoblöcke:</u>	
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg
<u>Waagen:</u>	
Analysenwaage (KERN 770)	WTM, München
Präzisionswaage (KERN 440-47)	WTM, München
Wasserbad (medingen WB6)	Preiss-Daimler, Dresden

Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial

Neben den Arbeitsmaterialien der Laborgrundausrüstung wurden folgende Materialien verwendet:

Einmal-Kapillarpipetten „end to end“ (minicaps 4 µl Na-hep, 4 und 20 µl)	Hirschmann [®] Laborgeräte, Eberstadt
Feindosierungsspritze (Injekt [®] -F, 1 ml)	Braun, Melsungen
Kanülen Fine-Ject [®] (30 G ½)	Henke-Sass, Wolf, Tuttlingen

Kanülen Sterican® (27 G ¾)	Braun, Melsungen
PCR 8er-Strips und Deckelstreifen	Braun, Wertheim
PCR Platten (ABgene® PCR Plates, 96-well)	Thermo Scientific
Pipettenspitzen (epT.I.P.S.)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter	Genuine AXYGEN Quality, Axygen, INC., Union City, USA
PP-Röhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Probenröhrchen Li 1000 A Standrand	KABE, Nümbrecht-Elsenroth
Probenröhrchen EDTA 1000 A Standrand	KABE, Nümbrecht-Elsenroth
Reaktionsgefäße (Eppendorf Tubes 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Tusche A, schwarz 17	Pelikan, Hannover

Chemikalien

Alle Chemikalien sind, soweit nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität verwendet worden.

Agarose, UltraPure™	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose, Universal	Bio&SELL, Nürnberg
Bromphenolblau Na-Salz, für Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Chloroform (Trichlormethan)	Merck, Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
Diethylether	Roth, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Biomol, Hamburg
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig), wasserfrei	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (1mg/ml)	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol (= 3-Methyl-1-butanol)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Sigma, Steinheim
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend, 37%)	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat), ultrapure	Roth, Karlsruhe
Spermidine	Sigma, Deisenhofen
Tris (Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan)	Roth, Karlsruhe

Enzyme, Kits und sonstige Reagenzien

BigDye® Terminator v3.1	Applied Biosystems, Weiterstadt
6x DNA Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot

DNase I (10 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot Roche, Mannheim
10x DNase I Puffer + MgCl ₂	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA (25mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
LMGE-Reagenzienpack	Scil, Viernheim
Proteinase K lypophil ≥ 30U/mg	Roth, Karlsruhe
QIAEX [®] II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Random Primer Hexamers	Invitrogen, Karlsruhe Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme (inkl. Puffer)	Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, Frankfurt/Main
RNasin	Promega, Mannheim
SuperScript II RT, 200 U/μl (inkl. 5x Erststrangpuffer und 0,1 M DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
TAQ DNA Polymerase 5U/μl (inkl. 10x PCR Puffer I)	Agrobigen, Hilgertshausen
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen, Karlsruhe

Molekulargewichtsstandards für DNA

GeneRuler [™] (1 kb DNA Ladder)	Fermentas, St. Leon Roth
pUC Mix 8	Fermentas, St. Leon Roth

2. Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Als Lösungsmittel diente, soweit nicht anders angegeben, durch eine Milliporeanlage (EASYpure[®] II, pure Aqua, Schnaitsee) aufbereitetes pyrogen-, RNase- und DNase freies Wasser (Aqua bidest.).

Puffer für molekularbiologische Methoden

DEPC-H₂O (0,1 %)

1 ml DEPC wurden in 1000 ml Aqua bidest. über Nacht bei Raumtemperatur (RT) unter Rühren gelöst und anschließend zweimal autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei RT.

10x DNase I-Puffer

250 mM	Tris/HCl (pH 8,3)
375 mM	KCl
15 mM	MgCl ₂

steril filtriert, autoklaviert und aliquotiert, Lagerung bei -20°C

Proteinase K-Lösung

20 mg	Proteinase K
ad 1 ml	Aqua bidest.

aliquotiert; Lagerung bei 4°C

T-Puffer

50 ml 10 mM Tris/HCl (pH 8,0, pH 8,3 oder pH 8,4)

Lagerung bei RT

Homogenisationspuffer

16 ml 0,5 M EDTA/NaOH (pH 8,0)

2,5 ml 20% SDS

8 ml 2 M Saccharose

10 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,0)

ad 100 ml Aqua bidest.

Lagerung bei RT

Cutting Buffer

2,5 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,0)

5,0 ml 0,5 M EDTA/NaOH (pH 8,0)

1,0 ml 5 M NaCl

250 µl 1 M DTT

127 µl Spermidine (500 mg/ml)

ad 50 ml Aqua bidest.

Lagerung bei 4°C

5x Sequenzierpuffer

17,5 ml 1 M Tris/HCl (pH 9,0)

125 µl 1 M MgCl₂

ad 50 ml Aqua bidest.

aliquotiert; Lagerung bei -20°C

Puffer für Agarosegele50x TAE

484 g 2 M Tris

200 ml 50 mM EDTA

114 ml Essigsäure

ad 2000ml Aqua bidest.

autoklaviert; Lagerung bei RT

1x TAE-Laufpuffer

200 ml 50x TAE

ad 10000 ml Aqua bidest.

Lagerung bei RT

10x BPB Ladepuffer

3 ml Glycerin
7 ml Aqua bidest.
1 Spatelspitze Bromphenolblau
ad 500 mM NaOH bis die Farbe blau wird
aliquotiert; Lagerung bei 4°C

Molekulargewichtsstandard

100 µl jeweiliger Standard
100 µl 6x DNA Ladepuffer
400 µl Aqua bidest.
aliquotiert; Lagerung bei -20°C

dNTP-Mix (2 mM)

je 100 µl aus je 100 mM Stocklösungen dATP, dCTP, dGTP und dTTP
4,6 ml Aqua bidest.
aliquotiert; Lagerung bei -20°C

Herstellung 1 mM dNTP-Mix: 50 µl 2 mM dNTP-Mix + 50 µl Aqua bidest.

10 mM dNTP-Mix: 1:10 Verdünnung

Chloroform-Isoamylalkohol (CiA)

96 ml Chloroform
4 ml Isoamylalkohol
Lagerung bei 4°C, lichtgeschützt

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCiA)

25 ml Phenol
25 ml CiA
Lagerung bei 4°C, lichtgeschützt

XII. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Bereitstellung des interessanten Themas.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Aigner für die stetige Unterstützung dieser Arbeit und die kritische und vor allem schnelle Durchsicht dieses Manuskriptes bedanken.

Frau Dr. Elisabeth Kemter danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit, insbesondere der morphologischen Untersuchung der „GMC“-Tiere und des Westernblots, die jederzeit hilfreiche Unterstützung und fachliche Beratung dieser Arbeit und für die gewissenhafte Durchsicht dieses Manuskriptes.

Einen lieben Dank an Frau Dr. Birgit Rathkolb für die immer währende Hilfestellung, die Beratung in allen Maus- und Blutchemiefragen, die phänotypische Untersuchung der Mauslinie HST001 innerhalb der „GMC“, insbesondere die Durchführung der Stoffwechselkäfiguntersuchungen, die Durchsicht dieses Manuskriptes und für die Abholdienste meiner Blutproben.

Bei Herrn Dr. Nikolai Klymiuk möchte ich mich ganz herzlich für die stetige Unterstützung bei allen biochemischen, labortechnischen Fragen und allgemein für das ständig „offene Ohr“ bedanken.

Frau Dr. Christina Landbrecht danke ich ganz besonders für die liebevolle Zusammenarbeit, die Einweihung in die Kunst des Mäuseblutens und für die sehr unterhaltsamen, fröhlichen, anregenden und fachlichen Gespräche (Tina, ich habe Dich sehr vermisst!).

Herrn Prof. Dr. Martin Hrabé de Angelis und dem gesamten Team der „German Mouse Clinic“ am Helmholtz Zentrum München möchte ich ganz herzlich für die aufwendige phänotypische Analyse der Mauslinie HST001 danken.

Frau Elfi Holupirek danke ich für die jederzeit prompte Messung meiner Blutproben.

Ein herzlicher Dank auch an Frau Kateryna Micklich für die Unterstützung der Untersuchungen der Mauslinie HST001 innerhalb der „GMC“.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Maushauses am Moorversuchsgut in Oberschleißheim möchte ich ganz herzlich für die exzellente Betreuung der Mäuse und für die Hilfsbereitschaft im Maushaus danken.

Frau Sissy Stärk danke ich für die Unterstützung bei Problemen mit dem Mikro-Osmometer.

Ein herzliches Dankeschön auch an Kristin Rößger für ihre stetige Unterstützung im Maushaus und Labor und an Tatjana Kremer für ihre Hilfe im Labor.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen meinen Kollegen und Mitdoktoranden, durch deren Freundschaft, Hilfe und Motivation diese Arbeit erst möglich war. Ohne spezielle Reihenfolge sind dies: Frau Katrin Wallner und Frau Dr. Annegret Wünsch, die mich in allen Belangen mit viel Geduld unterstützt haben, und deren Freundschaft ich nicht mehr missen möchte; Frau Katinka Burkhardt, Frau Andrea Bähr, Frau Pauline Fezert, Herr Sudhir Kumar, Frau Marieke Matthiesen, Frau Dr. Simone Renner, Frau Dr. Christiane Fehlings, Frau Dr. Barbara Kessler und Frau Dr. Mayuko Kurome, mit denen man zu jeder Zeit, ob im Lab-Seminar, im Labor oder in der Freizeit sehr viel Spaß hatte. Nicht unerwähnt bleiben sollen alle anderen nicht namentlich genannten, ehemaligen und jetzigen Mitarbeiter des Moorversuchsgutes Oberschleißheim für ihre gewährte Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch für die tatkräftige Unterstützung zahlreicher Kollegen, Bekannten und Freunde für die Programmierhilfen und Korrekturen.

Einen ganz lieben Dank an meine Eltern, Geschwister und Freunde, die mit mir alle Höhen und Tiefen des Studiums und der Promotion bereitwillig durchlebt haben.

Einen ganz lieben Dank an Ralf, der es mit mir nicht immer leicht hatte, vor allem in der Endphase dieser Doktorarbeit.