

**Salzverlusttubulopathie in einer Mauslinie mit
Nullmutation des Clcnk2 Gens**

von Alexandra Grill

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

Salzverlusttubulopathie in einer Mauslinie mit
Nullmutation des Clcnk2 Gens

von Alexandra Grill
aus Heidelberg

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. R. Wanke

Angefertigt am Institut für Physiologie der Universität Regensburg

Mentor: Univ.-Prof. Dr. H. Castrop

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wanke
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Sonja Härtle

Tag der Promotion: 11. Februar 2017

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Grundlagen der Nierenfunktion	2
1.1	Die Aufgaben der Niere	2
1.2	Die Morphologie der Niere	2
1.3	Das Nephron	3
1.4	Die Wasserrückresorption in der Niere im Zustand der Antidiurese.....	3
1.5	Der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife: Funktion & Ionentransporter	7
1.6	Die Pars convoluta des distalen Tubulus: Funktion und Ionentransporter	8
1.7	Die Regulation der Nierenfunktion.....	10
1.7.1	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	10
1.7.2	Die renale Autoregulation.....	11
2.	Der Anionenkanal ClC-Kb/ClC-K2	12
2.1	Die Familie der ClC-Kanäle	12
2.2	Der molekulare Aufbau und die Eigenschaften der ClC-Kanäle.....	12
2.3	Die Expression von ClC-Ka/1 und ClC-Kb/2 entlang des Nephrons	14
2.4	Die Funktion der ClC-K Kanäle	15
2.5	Die Untereinheit Barttin und ihre Bedeutung	18
2.6	Die Regulation der ClC-K Kanäle	19
3.	Erbliche Salzverlusttubulopathien	20
3.1	Das Bartter Syndrom.....	21
3.1.1	Die Pathogenese des Bartter Syndroms	21
3.1.2	Bartter I	25
3.1.3	Bartter II.....	26
3.1.4	Bartter III	27
3.1.4.1	Die Klinik des Bartter III	27
3.1.4.2	Bekannte Mutationen des Clcnkb Gens	28
3.1.5	Bartter IV	30
3.1.6	Bartter V.....	30
3.2	Das Gitelman Syndrom.....	31
3.2.1	Die Pathogenese des Gitelman Syndroms	31

3.2.2	Die Klinik des Gitelman-Syndroms.....	33
3.3	Die Behandlung der Salzverlusttubulopathien.....	34
3.4	Die Prognose bei Bartter & Gitelman Syndrom	35
3.5	Die Differenzialdiagnosen zu erblicher Salzverlusttubulopathie.....	36
III.	FRAGESTELLUNG.....	38
IV.	PUBLIKATION: „SALT-LOSING NEPHROPATHY IN MICE WITH A NULL MUTATION OF THE CLCNK2 GENE“ -GRILL ET AL. 2016 ACTA PHYSIOLOGICA.....	39
V.	DISKUSSION.....	82
1.	Generierung der Clcnk2 defizienten Mauslinie	82
2.	Deutliche Diurese und Natriurese bei CIC-K2 -/- Mäusen.....	83
2.1	Salz- und Wasserverlust bei CIC-K2 -/- Mäusen.....	83
2.2	Blutwerte und Urinparameter	84
3.	Die funktionelle Bedeutung des CIC-K2	85
3.1	Provokationsversuch zur Überprüfung der Konzentrierungsfähigkeit: Reaktion auf Wasserentzug.....	86
3.2	Provokationsversuche mit Diuretika zur Überprüfung der Beteiligung von CIC-Kb/2 an der NaCl-Resorption im TAL und DCT.....	88
3.3	Provokationsversuch zur Natriumkonservierung: Fütterung mit einer Niedrigsalzdiät	89
4.	Kompensationsmechanismen in CIC-K2 -/- Mäusen.....	90
4.1	Beteiligung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems	90
4.2	Bedeutung des Prostaglandin E2 und die Behandlung der CIC-K2 -/- Mäuse	91
5.	Übereinstimmung zwischen CIC-K2 -/- Maus und Bartter III.....	93
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	96
VII.	SUMMARY	98
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	100
IX.	ANHANG.....	115
1.	Publikationen und Präsentationen	115

	Publikationen	115
	Präsentationen	115
2.	Abbildungs-und Tabellenverzeichnis.....	116
3.	Abkürzungsverzeichnis	118
4.	Erklärung zum Copyright.....	122
5.	Erklärung zur Beteiligung der Koautoren an der Publikation „Salt- Losing Nephropathy in Mice with a Null Mutation of the Clcnk2 Gene“	123
X.	DANKSAGUNG.....	124

I. EINLEITUNG

Die Aufrechterhaltung eines physiologischen Blutdrucks durch das Herz-Kreislauf-System ist essenziell für das Überleben jedes Menschen oder Tieres. Die Niere leistet als zentrales Organ der Wasser- und Elektrolythomöostase einen entscheidenden Beitrag zur Konstanthaltung des Blutdrucks. Durch ihre enorme Resorptionsleistung verhindert sie den Verlust von Wasser und Nährstoffen, indem ein komplexes und fein abgestimmtes System aus Transportern und Kanälen wichtige Komponenten wieder zurückgewinnt und andere ausscheidet. Genetisch bedingte Funktionsverluste dieser Transportproteine führen unter anderem zu einer erblichen Salzverlusttubulopathie, die als Bartter Syndrom bezeichnet wird. Besonders in der Neonatalperiode muss diese Erkrankung als Ursache einer Entgleisung des Wasser- und Elektrolythaushaltes berücksichtigt werden. Zu den charakteristischen Symptomen zählen Polyurie, hypokaliämische Alkalose, Hyperprostaglandinurie und sekundärer Hyperaldosteronismus. Mittlerweile sind fünf verschiedene Bartter Typen bekannt, bei denen jeweils ein anderes Transportprotein verändert ist. Während bei den meisten dieser Subtypen bereits die Bedeutung des jeweiligen Transportproteins in *in vivo*-Modellen untersucht werden konnte, gibt es bis heute kein Modell für Bartter Typ III. Bei diesem Subtyp liegt eine Mutation des *Clcnkb* Gens vor, das für den ClC-Kb Kanal kodiert. Besonders auffällig ist bei betroffenen Patienten die große Heterogenität in der klinischen Ausprägung, sodass die Bedeutung dieses Anionenkanals für die Nierenfunktion bis heute nicht vollständig geklärt ist. Ein Tiermodell mit Funktionsverlust des ClC-Kb bietet also die Möglichkeit die Konsequenzen eines Funktionsverlusts von ClC-Kb, sowie die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp zu untersuchen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Grundlagen der Nierenfunktion

1.1 Die Aufgaben der Niere

Die wichtigste Aufgabe der Niere ist die Bildung des Harns und damit die Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen. Zu diesen Substanzen gehören beispielsweise Harnstoff und andere Stoffwechsel-Endprodukte, die ohne eine funktionierende Niere im Körper akkumulieren. Zusätzlich zur reinen Ausscheidungsfunktion konserviert sie aber auch Stoffe, die dem Körper erhalten bleiben sollen, indem diese entweder gar nicht erst filtriert oder filtriert und anschließend wieder rückresorbiert werden. Auch für die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes ist die Niere durch die Ausscheidung eines mehr oder weniger konzentrierten Urins und die dort stattfindenden Sekretions- und Resorptionsprozesse von großer Bedeutung. In der Folge hält sie darüber hinaus auch den Säure-Basen-Haushalt im Gleichgewicht und reguliert den Blutdruck. Auch für den Hormonhaushalt spielt die Niere eine wichtige Rolle. Sie ist einerseits der Produktionsort von Hormonen und beeinflusst über Renin den Blutdruck, über Erythropoetin die Blutbildung und durch Calcitriol den Knochenstoffwechsel. Andererseits ist die Niere selbst Zielorgan einiger Hormone und metabolisiert wiederum andere Hormone, die extrarenal gebildet wurden (Engelhardt and Breves, 2005, Pape et al., 2014).

1.2 Die Morphologie der Niere

Die Nieren des Menschen und der kleinen Labortiere sind bohnenförmige Organe, die retroperitoneal in der Bauchhöhle beidseits der Wirbelsäule liegen und von einer festen Bindegewebskapsel umgeben sind. Am Nierenhilus, der konkaven Seite der Niere, treten Nerven, Blut- und Lymphgefäße in die Niere ein und verlassen sie wieder. Hier tritt auch der Harnleiter aus der Niere aus, der den Endharn in die Harnblase leitet. Das Nierengewebe gliedert sich in die äußere Rinde (Cortex), das innere Mark (Medulla) und das Nierenbecken (Pelvis). In der Medulla liegen die nach innen zulaufenden Papillen, in denen die Sammelrohre enden und den Urin in das Nierenbecken ableiten.

Die Blutversorgung der Niere erfolgt über jeweils eine Arteria (A.) renalis, die direkt aus der Aorta abdominalis entspringt. Sie verzweigt sich weiter in Arteriae (Aa.) interlobares, arcuatae, interlobulares und schließlich in die afferenten Arteriolen (Vasa

afferentia). Aus der Vas afferens geht das Kapillarknäuel des Nierenkörperchens (Glomerulus) hervor, an dessen Ende sich das Blut wieder in der efferenten Arteriole (Vas efferens) sammelt. Das Vas efferens leitet das Blut in das peritubuläre Kapillarnetz oder die Vasa recta. Das venöse Blut wird über Venae (Vv.) interlobulares, arcuatae und interlobares zusammen geleitet und verlässt über die Vena (V.) renalis letztendlich die Niere (Nickel et al., 2004).

1.3 Das Nephron

Das Nephron, bestehend aus dem Nierenkörperchen (Corpusculum renale) und dem Nierenkanälchen (Tubulus), bildet die kleinste funktionelle Einheit der Niere. Insgesamt setzt sich die menschliche Niere aus ca. einer Million Nephrone zusammen, die für die Filtration des Primärharns und die anschließende Resorption und Sekretion von Stoffen verantwortlich sind. Diese Vorgänge führen letztendlich zur Entstehung des Sekundärharns, der dann ausgeschieden wird. Im Glomerulus wird dafür aus dem Blut der Kapillarschlingen durch die Filtrationsbarriere hindurch der Primärharn in das Lumen der Bowman'schen Kapsel ausgepresst. Im sich anschließenden Tubulussystem wird in den verschiedenen Abschnitten eine Reihe von Stoffen resorbiert, aber auch sezerniert, sodass das Volumen des Sekundär- oder Endharns nur noch etwa 1 % der Ultrafiltratmenge beträgt. Das Tubulussystem lässt sich in vier Abschnitte unterteilen: den proximalen Tubulus mit Pars convoluta (PCT) und Pars recta (PST), den Intermediärtubulus mit Pars descendens (DTL) und Pars ascendens (ATL), den distalen Tubulus mit Pars recta (TAL) und Pars convoluta (DCT) und als letztes das Sammelrohr bestehend aus dem Verbindungstubulus (CNT) und dem eigentlichen Sammelrohr (CD). Die von PST, DTL, ATL und TAL gebildete U-förmige Schlinge wird als Henle-Schleife bezeichnet. Jeder Abschnitt weist eine charakteristische Ansammlung von Transportern und Ionenkanälen sowie eine individuelle Permeabilität für Wasser und andere Stoffe auf und trägt so in unterschiedlichem Umfang zur Bildung des Sekundärharns bei. Am Ende des Tubulussystems wird der Endharn durch die Sammelrohre in das Nierenbecken geleitet und sammelt sich dort (Pape et al., 2014). Die Lagebeziehung der einzelnen Nephronabschnitte sowie ihre Benennung ist in Abbildung 1 dargestellt.

1.4 Die Wasserrückresorption in der Niere im Zustand der Antidiurese

Nachdem in den Glomeruli eines erwachsenen Menschen etwa 180 Liter Wasser pro Tag aus dem Blut filtriert werden, wird der überwiegende Teil des Wassers im sich

anschließenden Tubulussystem resorbiert, sodass am Ende nur unter ein Prozent der ursprünglich filtrierte Menge mit dem Urin ausgeschieden wird. Die Rückgewinnung des Wassers entlang des Nephrons geschieht vorwiegend passiv, indem entlang des Tubulussystems der Transport von Wasser dem osmotischen Druck folgt, der durch die Resorption von Natriumchlorid (NaCl) entsteht. Darüber hinaus bestimmt die Wasserpermeabilität den Umfang der Wasseraufnahme im jeweiligen Tubulusabschnitt. Die Wasserpermeabilität ist wiederum abhängig von der Art des Epithels. In lecken Epithelien gelangt Wasser durch den Interzellularspalt und die Schlussleiste, in dichten Epithelien werden Wasserkanäle (Aquaporine) für den transzellulären Übertritt benötigt (Engelhardt and Breves, 2005).

Im Stadium der Antidiurese kann je nach Tierart der Urin auf das vier- bis zwölfwache der Plasmaosmolarität aufkonzentriert werden. Wichtigste Voraussetzung für diese Fähigkeit ist das Gegenstromprinzip im Nierenmark. Die für das Gegenstromprinzip entscheidenden anatomischen und funktionellen Strukturen sind 1.) die Henle-Schleife mit der NaCl-Resorption im TAL und der Wasserimpermeabilität des TAL, 2.) das Sammelrohr mit der dortigen Harnstoffresorption im medullären Teil und der ADH (antidiuretisches Hormon)-abhängigen Wasserpermeabilität und 3.) die Gefäßbündel der Vasa recta, die im Markbereich geringer durchblutet werden.

In der Henle-Schleife fließt der Harn zunächst im absteigenden Teil in Richtung Nierenmark und anschließend durch den aufsteigenden Teil wieder Richtung Cortex. Im TAL wird aktiv NaCl resorbiert, das Wasser kann hier jedoch nicht folgen, weil dieser Teil für Wasser impermeabel ist. Dadurch sinkt die Osmolarität im Tubulus, während sie im Interstitium ansteigt. Durch die kontinuierliche Strömung im Tubulus entsteht so ein in Richtung des Marks zunehmend hyperosmotisches Interstitium. Aufgrund der Differenz der Osmolarität zwischen Tubuluslumen und Interstitium, strömt nun Wasser aus dem hochpermeablen absteigenden Teil der Henle-Schleife in das Interstitium ein und die Konzentration des Harns steigt an. Diese Gegenstrommultiplikation ist auf die äußere Medulla beschränkt. Der Anstieg des interstitiellen osmotischen Drucks verursacht in Anwesenheit von ADH die weitere Resorption von Wasser in den Sammelrohren der äußeren Medulla (Engelhardt and Breves, 2005, Schnermann and Sayegh, 1998).

Eine zusätzliche Aufkonzentrierung des Harns erfolgt unter Zuhilfenahme von Harnstoff. Da der Cortex und die medullären Sammelrohre für Harnstoff so gut wie undurchlässig sind, steigt seine Konzentration durch die Wasserresorption in diesem

Abschnitt an. Das erzeugt einen Konzentrationsgradienten zur inneren Medulla, wo die Harnstoffpermeabilität abhängig von ADH mehr oder weniger hoch ist. Der resorbierte Harnstoff akkumuliert in der inneren Medulla und zieht dort Wasser aus dem absteigenden Teil der Henle-Schleife. Ein Teil des Harnstoffs wird außerdem wieder in den Tubulus sezerniert (Schnermann and Sayegh, 1998).

Abbildung 1 gibt einen Überblick über den Anteil der einzelnen Tubulusabschnitte an der Gesamtresorptionsleistung von Wasser und Elektrolyten im Verlauf des Nephrons. Den größten Anteil an der Wasserresorption hat der proximale Tubulus mit ca. 65 % der filtrierten Wassermenge. Im Bereich der Henle-Schleife werden weitere 25 % und im DCT ca. 10 % zurückgewonnen. Im Sammelrohr ist der Transport von Wasser, wie oben bereits erwähnt, vom antidiuretischen Hormon (ADH) abhängig, das den Einbau der Aquaporin 2-Kanäle reguliert (Schnermann and Sayegh, 1998).

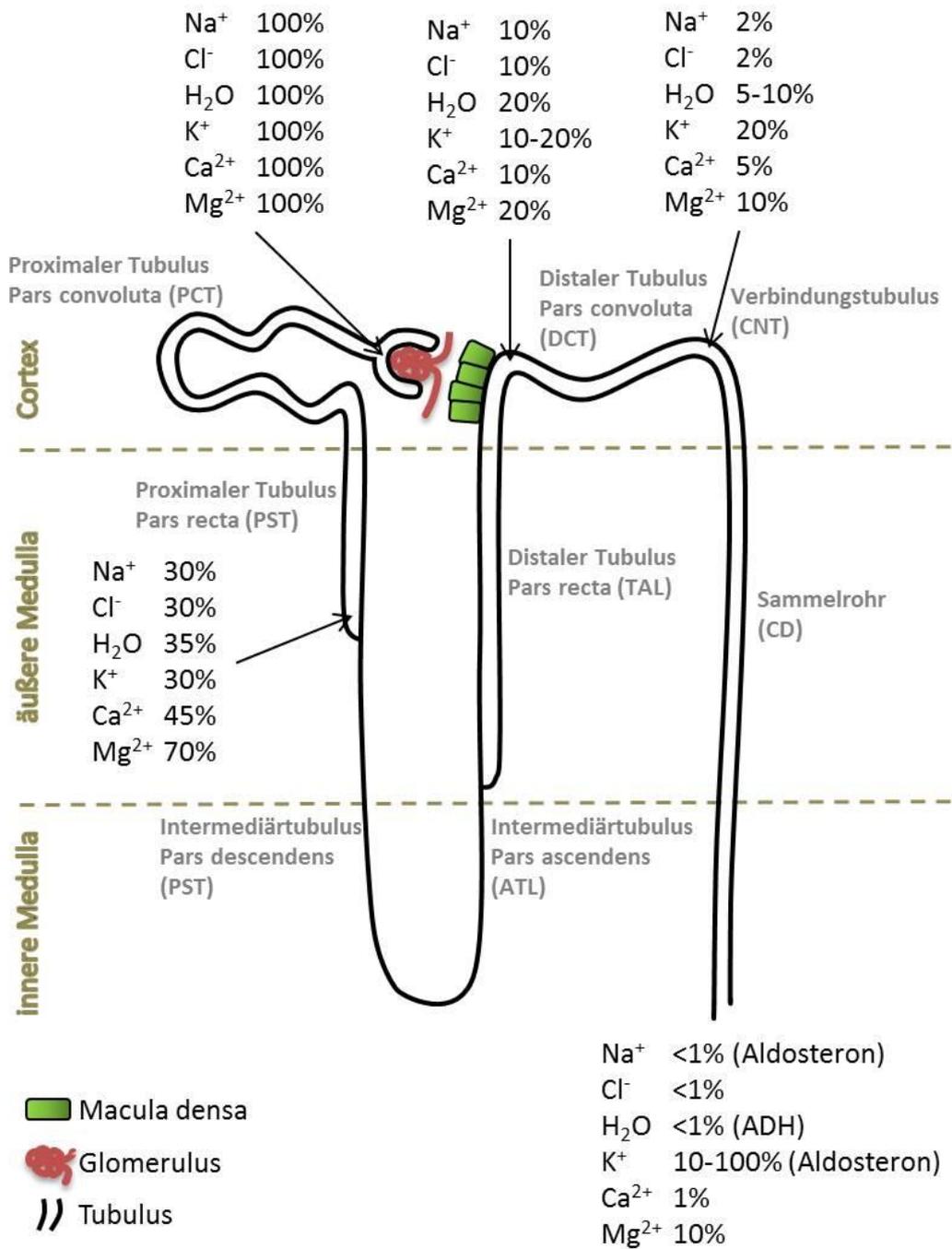


Abbildung 1 Resorptionsvorgänge von Wasser und Elektrolyten entlang des Nephrons im Zustand der Antidiurese, sowie Lagebeziehung des Glomerulums (rot) und der Macula densa Zellen (grün). Die Prozentangaben beziehen sich auf die noch vorhandene Menge im Verhältnis zur ursprünglich filtrierte Menge („load“). Je nach Plasmakonzentration wird Kalium im distalen Nephronabschnitt resorbiert oder sezerniert (Engelhardt and Breves, 2005). Die einzelnen Nephronabschnitte sind in grau benannt.

1.5 Der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife: Funktion & Ionentransporter

Dem dicken aufsteigenden und wasserundurchlässigen Teil der Henle-Schleife kommt bezüglich der Aufkonzentrierung des Primärharns eine besondere Bedeutung zu. In diesem Tubulusabschnitt werden aufgrund seiner hohen Resorptionskapazität circa 25 % des filtrierten NaCl wieder zurückgewonnen. Zusätzlich ist dieses Tubulussegment für Wasser weitgehend undurchlässig, sodass durch die aktive transzelluläre Rückresorption von NaCl ein transepithelialer osmotischer Gradient entsteht, der den Wassertransport im absteigenden Teil der Henle-Schleife antreibt. Einschränkungen der Funktion des TAL führen zu einem starken Verlust von Wasser und Salz mit dem Urin (Schnermann and Sayegh, 1998).

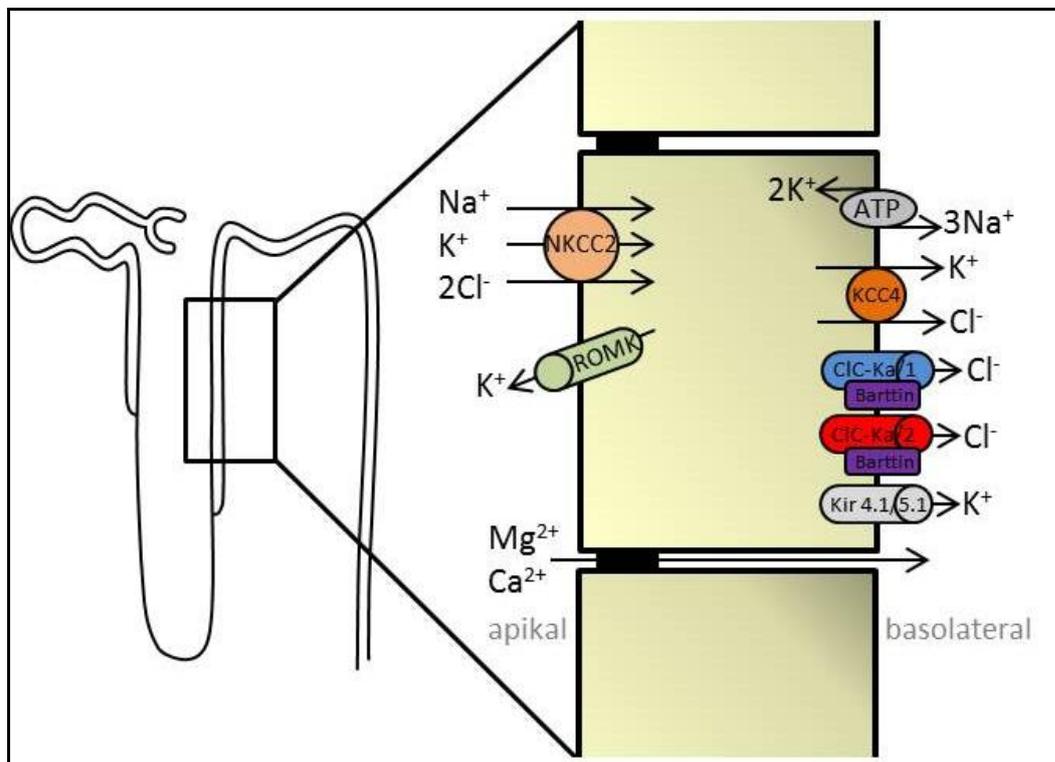


Abbildung 2 Resorption von Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium und Magnesium im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife mit Darstellung der Ionentransporter und -kanäle an der apikalen und basolateralen Zellmembran.

Die Funktion des TAL ist in besonderem Maße geprägt durch die Aufnahme von Natrium, Kalium und Chlorid über den für dieses Tubulussegment charakteristischen apikalen Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter NKCC2. Er agiert als Symporter und transportiert Natrium und Kalium zusammen mit Chlorid im Verhältnis 1:1:2 in die

Zelle. Das Schleifendiuretikum Furosemid kann die Funktion des NKCC2 blockieren. Die intrazelluläre Natriumkonzentration wird durch die Aktivität der basolateralen Natrium-Kalium-ATPase niedrig gehalten, indem Natrium im Austausch gegen Kalium ins Blut abgegeben wird. Das in die Zelle aufgenommene Chlorid verlässt diese an der basolateralen Zellemembran durch die beiden Anionenkanäle ClC-Ka (bzw. ClC-K1) und ClC-Kb (bzw. ClC-K2) und den Kalium-Chlorid-Cotransporter KCC4. Kalium hingegen wird an der apikalen Membran über den Kalium-Kanal ROMK recycelt. Hierdurch wird die lumenale Membran hyperpolarisiert und es entsteht ein hohes lumenpositives, transepitheliales Potenzial. Diesem Potenzial folgen Kationen wie Magnesium, Calcium und auch Natrium parazellulär und passiv (siehe Abbildung 2) (Greger, 1985, Seyberth and Schlingmann, 2011).

Zusätzlich zur NaCl-Resorption kommt dem TAL über die sich aus ihm entwickelnden Macula densa Zellen eine wichtige regulatorische Rolle zu. Diese spezialisierten Zellen finden sich im distalen Abschnitt des TAL und stehen in engem Kontakt zum Glomerulus. Hier nehmen sie über den tubuloglomerulären Rückkopplungs-(Feedback)-Mechanismus Einfluss auf den präglomerulären Widerstand und modulieren die Reninfreisetzung aus den granulären Zellen der afferenten Arteriole. Für ihre Funktion nutzen sie das gleiche Repertoire an Kanälen und Transportern, das auch in den TAL-Zellen zu finden ist (Seyberth and Schlingmann, 2011).

1.6 Die Pars convoluta des distalen Tubulus: Funktion und Ionentransporter

Im Vergleich zum TAL trägt der DCT mit ca. 10 % der Salzresorption aus dem Harn einen geringeren Anteil zur NaCl-Rückgewinnung bei.

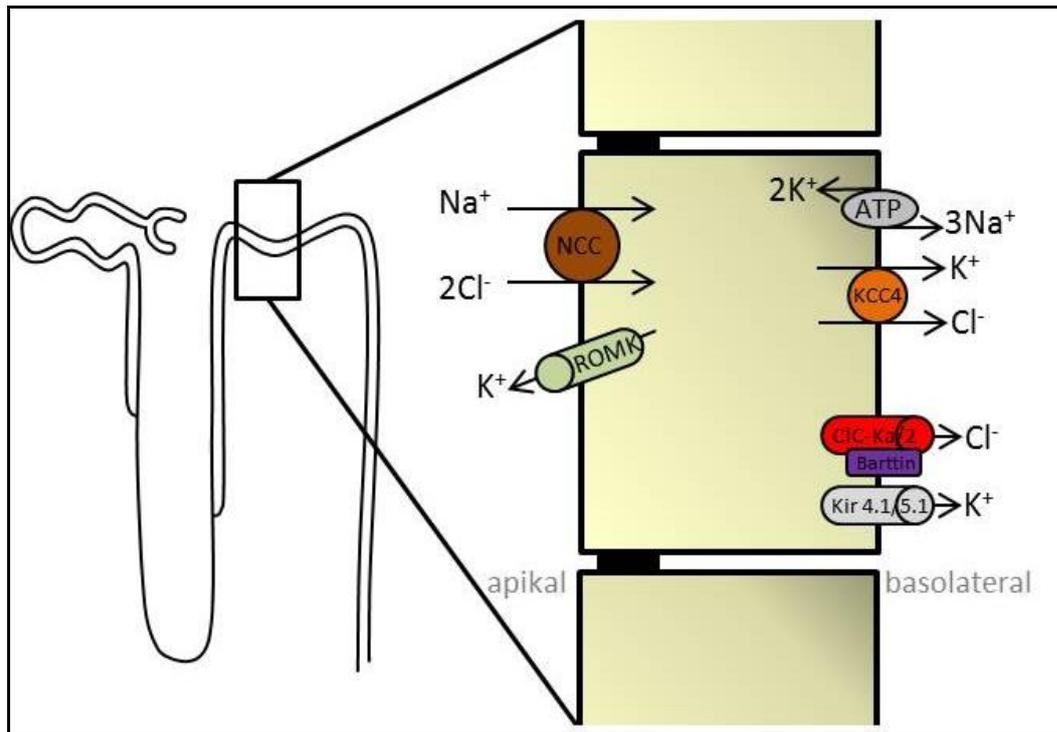


Abbildung 3 Resorption von Natrium, Kalium und Chlorid in der frühen Pars convoluta des distalen Tubulus (DCT1); Darstellung ohne die Resorption von Calcium und Magnesium.

Wie im TAL ist auch im DCT die basolaterale Natrium-Kalium-ATPase der Antrieb für den transepithelialen Salztransport. Der Natrium-Chlorid-Cotransporter NCC nutzt im frühen DCT (DCT1) den elektrischen Gradienten für Natrium, um Chlorid zusammen mit Natrium in die Zelle aufzunehmen. Chlorid verlässt die Zelle über den basolateralen ClC-Kb/2 Kanal und den Kalium-Chlorid-Cotransporter KCC4. Die Expression des NCC ist stromabwärts geringer, sodass sie im DCT2 mit dem eher distal befindlichen epithelialen Natrium-Kanal ENaC überlappt (Seyberth and Schlingmann, 2011). Auch in diesem Abschnitt kann Kalium apikal über ROMK die Zelle wieder verlassen (siehe Abbildung 3). Im Vergleich zum TAL erfolgt die Calcium- und Magnesiumresorption aktiv und transzellulär. Calcium wird über apikale TRPV5- Ca^{2+} -Kanäle in die Zelle aufgenommen, dort wird Calcium an Calbindin gebunden und an der basolateralen Membran über einen $3\text{Na}^+/1\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX1) oder eine Ca^{2+} -ATPase (PMCA1b) ausgeschleust (Engelhardt and Breves, 2005). Magnesium wird wahrscheinlich durch den Mg^{2+} -Kanal TRPM6 in die Zelle aufgenommen. Vermutlich wird es intrazellulär ebenfalls an ein Transportprotein gebunden. Wie genau Magnesium die Zelle an der basolateralen Seite wieder verlässt, ist bisher unbekannt (Schlingmann et al., 2002).

Durch Aldosteron wird die Aufnahme von Natrium und Chlorid in diesem Tubulusabschnitt verstärkt. Die zu therapeutischen Zwecken eingesetzten Thiaziddiuretika hemmen die Aktivität von NCC und damit auch die Funktion des DCT (Pape et al., 2014).

1.7 Die Regulation der Nierenfunktion

1.7.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der Wasser- und Elektrolythomöostase und damit auch bei der Regulation des Blutdrucks. Das proteolytische Enzym Renin wird im distalen Tubulus aus den Granulazellen des juxtaglomerulären Apparates in das Blut freigesetzt. Die Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen ist der erste und limitierende Schritt der RAAS-Aktivierung. Sie wird durch den Abfall des renalen Perfusionsdrucks, den Abfall der tubulären NaCl-Konzentration im Bereich der Macula densa, die Aktivierung der renalen sympathischen Innervation über β_1 -Adrenorezeptoren und durch eine verminderte Konzentration lokal wirksamer Hormone wie Angiotensin II (AngII) stimuliert. Auf zellulärer Ebene wird die Reninfreisetzung durch Prostaglandine und Stickstoffmonoxid auf parakrinem Weg vermittelt. Beide stimulieren die Bildung bzw. verhindern den Abbau von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), das wiederum intrazellulär die Freisetzung des Renins in den juxtaglomerulären Zellen aktiviert (Schweda et al., 2007). Im Blut spaltet Renin von dem aus der Leber stammenden Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab. Dieses wird nachfolgend mittels des Angiotensin-konvertierenden Enzymes (ACE) zum aktiven Effektormolekül dieser Kaskade, dem Oktapeptid AngII, hydrolysiert. AngII kann an zwei verschiedene Rezeptoren, AT₁ und AT₂, binden und wirkt sowohl lokal in der Niere als auch systemisch antinatriuretisch. Die AngII-abhängigen Effekte in der Niere werden vor allem durch den AT₁-Rezeptor vermittelt und sorgen für eine Aktivierung der Natrium-Kalium-ATPase in der basolateralen Zellmembran und von Natrium-Bikarbonat-Transportern in der apikalen Membran des Tubulusepithels. AngII wirkt außerdem vasokonstriktorisch und erhöht die Freisetzung des Steroidhormons Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Durch Aldosteron werden die Expression und der Einbau von ENaC-Kanälen im CNT und CD gesteigert. In der Summe führt die Aktivierung des RAAS zu einer Erhöhung der Wasser- und Natriumresorption in der Niere und damit zu einem Blutdruckanstieg (Castrop et al., 2010).

1.7.2 Die renale Autoregulation

Im Bereich eines arteriellen Mitteldrucks von 80 bis 180 mmHg wird durch die renale Autoregulation die Nierendurchblutung und damit auch die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und der renale Blutfluss relativ konstant gehalten. Diese Regulation ist allerdings auf einen physiologischen Rahmen beschränkt, sodass es bei zu starkem Blutdruckabfall beispielsweise im Schockgeschehen zu einem Abfall der GFR kommt. Grundsätzlich sind zwei verschiedene Mechanismen an der renalen Autoregulation beteiligt:

Der tubuloglomeruläre Rückkopplungs-(Feedback)-Mechanismus (TGF) macht sich eine anatomische Besonderheit des TAL zu nutze. Hier steht die in der Tubuluswand des TAL gelegene Macula densa (MD) als Teil des juxtaglomerulären Apparates in direktem Kontakt zum eigenen Glomerulus (siehe Abbildung 1). Die Macula densa Zellen nehmen NaCl aus dem Tubulus auf. Beispielsweise steigen bei einem Anstieg des Blutdrucks auch die GFR und damit die Flussrate im Tubulus an. Aufgrund der limitierten NaCl-Resorptionskapazität des Tubulussystems würden dem Organismus somit wichtige Mengen an NaCl verloren gehen. Der TGF verhindert dies, indem bei einem Anstieg der NaCl-Konzentration an der MD reflektorisch eine Konstriktion der afferenten Arteriolen erfolgt, was die GFR wieder absenkt. Dadurch sinkt die Flussrate im Tubulus und damit auch die luminale NaCl-Konzentration. Dieser Regelkreis läuft permanent ab und hält die NaCl-Ausscheidung sowohl bei einem Anstieg über eine Vasokonstriktion als auch bei einem Abfall des Blutdrucks über die Vasodilatation der afferenten Arteriole konstant (Schnermann and Sayegh, 1998).

Der zweite Mechanismus, der sogenannte Bayliss-Effekt oder auch myogener Mechanismus, beruht darauf, dass glatte Muskelfasern, nachdem sie eine Dehnung erfahren haben, ihren Tonus erhöhen und kontrahieren. Dieser Mechanismus ist besonders bei einem akuten Blutdruckanstieg von Bedeutung. Diese lokale Regulation des Blutkreislaufs ist nicht nur auf die Niere beschränkt, sondern findet sich auch im Magen-Darm-Trakt und dem Gehirn. Sie trägt unabhängig vom vegetativen Nervensystem zur Aufrechterhaltung einer konstanten Durchblutung dieser Organe bei (Engelhardt and Breves, 2005).

2. Der Anionenkanal ClC-Kb/ClC-K2

2.1 Die Familie der ClC-Kanäle

Der ClC-Kb Kanal gehört zur Familie der Anionenkanäle/-Transporter, die zu Beginn der 1990er Jahre erstmalig beschrieben wurden (Jentsch et al., 1990). ClC-Kanäle sind in den unterschiedlichsten Geweben zu finden und übernehmen diverse Funktionen. Mittlerweile sind neun Isoformen im Säugetier bekannt, von denen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka (bzw. ClC-K1 bei Maus und Ratte) und ClC-Kb (bzw. ClC-K2 bei Maus und Ratte) als Kanäle und ClC-3 bis ClC-7 als Anionen-Protonen-Austauscher/Transporter agieren (Jentsch, 2008). Während ClC-Austauscher in intrazellulären Organellen wie Endosomen oder Lysosomen exprimiert sind, sorgen ClC-Kanäle in der Zellmembran von Epithelzellen für deren Erregbarkeit und den Transport von Elektrolyten, Wasser und Nährstoffen (Fahlke and Fischer, 2010). Ein Wechsel der Funktion vom Anionenkanal zum Cl^-/H^+ oder $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher kann bis heute nicht erklärt werden, ist aber vermutlich vom Protonierungsstatus des Proteins abhängig (Stolting et al., 2014). Einige der ClC-Kanäle benötigen eine essentielle Untereinheit, um funktionsfähig zu sein (Estevez et al., 2001). Auch pathologisch sind die ClC-Kanäle von Bedeutung, da heutzutage jedem einzelnen ClC-Kanal eine Erkrankung zugeordnet werden kann, die durch eine Veränderung des ihm zugrundeliegenden Gens verursacht wird (Stolting et al., 2014).

2.2 Der molekulare Aufbau und die Eigenschaften der ClC-Kanäle

Bei den ClC-Kanälen handelt es sich um Dimere, die 687 Aminosäuren umfassen. Jedes ClC-Monomer besteht aus 18 Helices (A bis R), gefolgt von einem zytosolischen Carboxy-Terminus, der zwei Cystathionin- β -Synthase (CBS) Domänen enthält (Bateman, 1997, Dutzler et al., 2002). Die Monomere sind als antiparallele, strukturell verwandte Hälften (α -Helix A bis I und J bis R) angeordnet, wobei nicht jede der Helices durch die Zellmembran hindurch reicht (Dutzler et al., 2002). Die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Kanäle sind nur unzureichend erforscht. Obwohl die ClCs häufig als Chloridkanäle bezeichnet werden, sind sie für alle Anionen passierbar. Die folgende Permeabilitätshierarchie wurde in *Xenopus-laevis*-Oocyten ermittelt: Chlorid > Bromid > Nitrat > Iodid (Stolting et al., 2014). Die Untereinheiten binden Anionen unabhängig vom Schwester-Monomer, was für die Existenz von zwei unabhängigen Aktivitätszentren spricht. Dies hat sich schon bei Einzelkanalanalysen angedeutet, bei denen die Existenz von zwei unterschiedlich schnellen Ionenleitwegen,

so genannten Protoporen, pro ClC-Kanal nachgewiesen wurde (Miller, 1982, Miller and White, 1984). Mit Hilfe einer 3D-Rekonstruktion konnte gezeigt werden, dass jedes Monomer über insgesamt drei unabhängige Chlorid-Bindungsstellen verfügt (Dutzler et al., 2002). Diese Bindungsstellen werden von den N-Termini der α -Helices D und F in der ersten Hälfte des Monomers und von den α -Helices N und R in der zweiten Hälfte des Monomers gebildet. Darüber hinaus besitzt jeder Kanal Bindungsstellen für Calcium und H^+ -Ionen, die für die Regulation der Kanalfunktion eine wichtige Rolle spielen (siehe 2.6 Die Regulation der ClC-K Kanäle).

Beispielhaft für den Aufbau der ClC-Kanäle zeigt Abbildung 4 ein Modell des ClC-Kb Kanals.

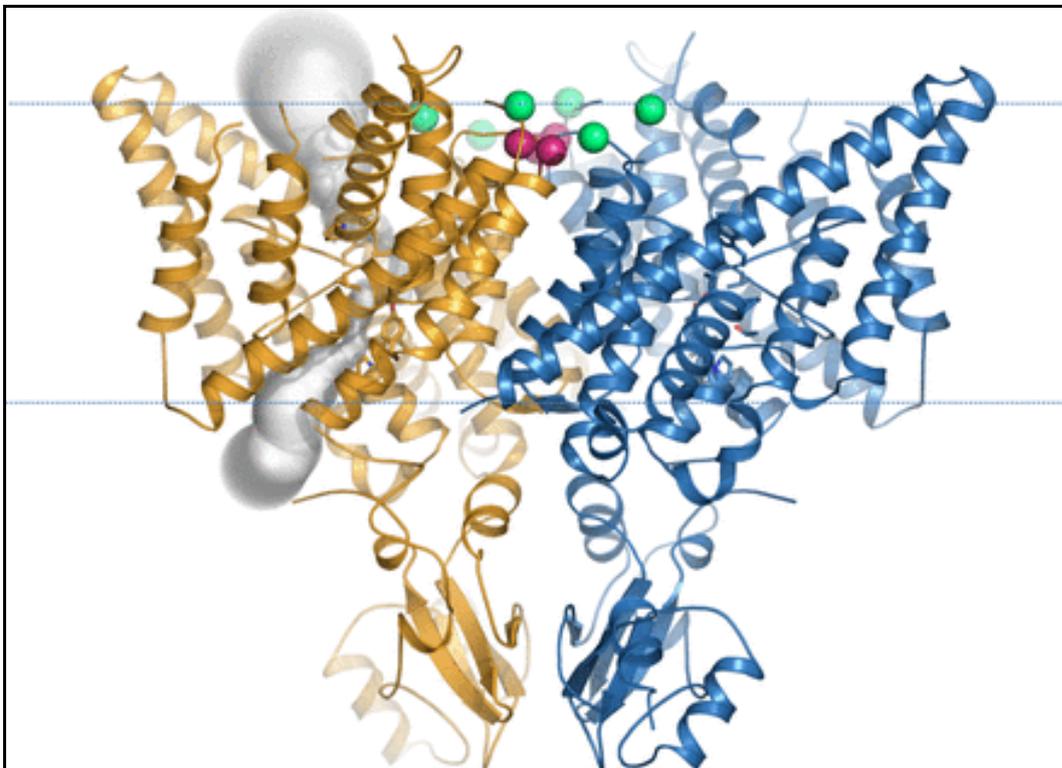


Abbildung 4 Modell des ClC-Kb Kanals entnommen aus Andrini et al., 2015. Seitenansicht der Dimerstruktur des ClC-Kb Kanals. Die Abgrenzung der Zellmembran ist als gepunktete Linie, die Monomere sind in orange und blau eingezeichnet. Die Pore des linken Monomers ist als hellgrauer Kanal abgebildet. Grüne Kugeln stellen die Ca^{2+} -Bindungsstelle, pinke Kugeln die H^+ -Bindungsstelle dar.

Eine Untergruppe der ClC-Kanäle bilden die ClC-K Kanäle, die in der Niere (K= „kidney“) und im Innenohr exprimiert werden. Sie unterscheiden sich von den übrigen ClC-Kanälen nicht nur durch ihre Lokalisation, sondern auch durch die Notwendigkeit

der akzessorischen Untereinheit Barttin für die Funktionalität (siehe 2.4 Die Untereinheit Barttin und ihre Bedeutung). Grundsätzlich sind die CIC-K Kanäle dazu in der Lage Anionen sowohl in die Zelle hinein als auch aus ihr heraus zu leiten. Die Richtung des Stroms folgt dabei dem transepithelialen Potenzial. Insgesamt sind in der Niere zwei verschiedene Isoformen der CIC-Familie bekannt. Sie werden beim Menschen CIC-Ka und CIC-Kb genannt, während sie in der Maus und Ratte als CIC-K1 und CIC-K2 bezeichnet werden. Neuere Studien zeigten, dass es sich bei CIC-K1 um einen 45pS-Kanal und bei CIC-K2 vermutlich um einen 10pS-Kanal handelt (L'Hoste et al., 2013, Lourdel et al., 2003).

Zwischen den beiden CIC-K Isoformen besteht eine sehr hohe Homologie von etwa 80-90 % innerhalb einer Spezies. Weiterhin ist der humane CIC-Kb Kanal nahezu identisch mit dem der Maus oder Ratte, sodass diese als funktionelle Orthologe angesehen werden. Gleiches gilt für den humanen CIC-Ka Kanal und den murinen CIC-K1 Kanal (Kieferle et al., 1994, Uchida and Sasaki, 2005, Stauber et al., 2012). In der Folge wird deshalb die Bezeichnung CIC-Ka/1 und CIC-K2/b verwendet, wenn Aussagen sowohl für den Menschen als auch für Maus und Ratte gelten.

2.3 Die Expression von CIC-Ka/1 und CIC-Kb/2 entlang des Nephrons

Die CIC-K Kanäle sind in der Niere im distalen Nephron vom Beginn des dünnen aufsteigenden Teils der Henle-Schleife bis zu den interkalierenden Zellen des Sammelrohrs präsent. Mit Ausnahme des ATL, wo sie sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Membran vorkommen, ist ihre Expression auf die Basalmembran beschränkt (Estevez et al., 2001). Die Unterscheidung zwischen den beiden Isoformen mittels eines Antikörpers ist bis heute aufgrund der großen Homologie nicht möglich. Erst durch die Generierung einer CIC-K1 defizienten Maus und die anschließende histologische Untersuchung der Nierenschnitte dieser Mauslinie mit einem CIC-K Antikörper, konnte das Expressionsmuster von CIC-K1 und CIC-K2 in der murinen Niere *in vivo* aufgedeckt werden. Wie sich herausstellte, ist CIC-K1 als einzige Isoform im ATL vorhanden, während sowohl CIC-K1 als auch CIC-K2 im TAL zu finden sind (Matsumura et al., 1999). Zusätzlich zur dominanten Expression im TAL konnte später auch die Expression von CIC-K2 in weiter stromabwärts gelegenen Teilen des Nephrons, genauer im DCT und CD, bewiesen werden (Vitzthum et al., 2002).

Die genaue Lokalisation und das Expressionsmuster des korrelierenden humanen CIC-Kb Kanals konnten von Kobayashi et al. 2002 in einer Mauslinie beschrieben

werden, die das grüne Fluoreszenzprotein GFP gekoppelt an humanes CIC-Kb exprimiert. Die Gruppe konnte über den Nachweis der Fluoreszenzfärbung zeigen, dass CIC-Kb in der basolateralen Zellmembran des TAL, DCT, CNT und den interkalierenden Zellen des CDs zu finden ist. Damit zeigte diese Mauslinie das gleiche Expressionsmuster für humanes CIC-Kb, das auch schon in der CIC-K1 $-/-$ Maus für CIC-K2 nachgewiesen wurde. Dies macht einmal mehr deutlich, dass es sich bei CIC-Kb und CIC-K2 um funktionelle Orthologe handelt (Kieferle et al., 1994).

Eine Zusammenfassung des Expressionsmusters von CIC-Ka/1 und CIC-Kb/2 im Nephron ist in Abbildung 5 dargestellt.

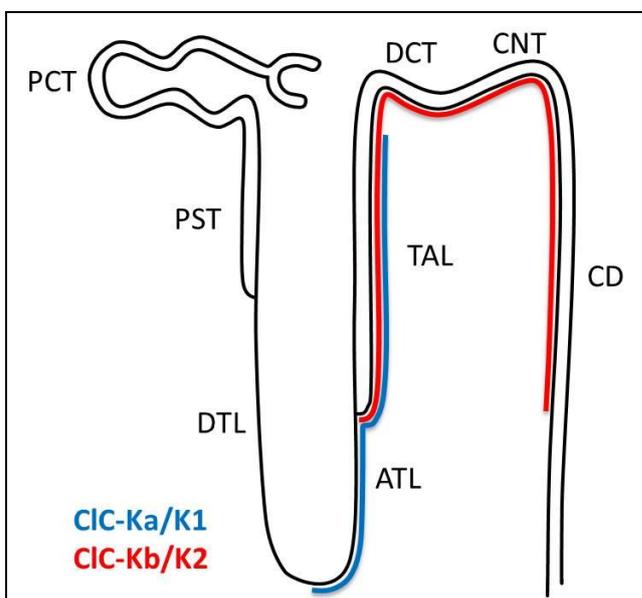


Abbildung 5 Expressionsmuster des CIC-Ka/1 (blau) und CIC-Kb/2 (rot) entlang des Nephrons.

Der Vollständigkeit halber sollte erwähnt werden, dass sowohl CIC-Ka/1 als auch CIC-Kb/2 im Innenohr in den Marginalzellen der Stria vascularis und in den dunklen Zellen des Vestibularorgans in der Basalmembran exprimiert sind (Lang et al., 2007).

2.4 Die Funktion der CIC-K Kanäle

Aus dem Expressionsmuster der CIC-K Kanäle ergibt sich ihre Bedeutung für die Organfunktion von Ohr und Niere. Im Innenohr sorgen die CIC-K Kanäle für die basolaterale Chloridleitfähigkeit und sind Teil des Kalium-sezernierenden Epithels. In der Niere sind sie ein wichtiger Regulator der Elektrolyt- und Wasserbalance, des zirkulierenden Volumens und damit auch des Blutdrucks.

Wie oben erwähnt ist ClC-Ka/1 in der Niere sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Membran des dünnen aufsteigenden Teils der Henle-Schleife (ATL) zu finden. Im TAL hingegen ist er nur an der basolateralen Zellmembran vorhanden und ermöglicht den Austritt von Chloridionen aus der Zelle in die Blutbahn.

Über die Funktion des ClC-K1 in der Niere konnten durch die Generierung und Phänotypisierung einer ClC-K1 defizienten Mauslinie tiefere Einblicke gewonnen werden. Matsumura et al. beschrieben bereits 1999 erstmals Symptome eines renalen Diabetes insipidus in ClC-K1 $-/-$ Tieren. Obwohl die Mäuse äußerlich unauffällig waren, zeigte eine genauere Phänotypisierung ein erhöhtes Urinvolumen und eine um die Hälfte verringerte Urinosmolarität in den Knockouts (KOs) (Matsumura et al., 1999). Die fraktionelle Exkretion von Natrium und Chlorid war jedoch unverändert, was darauf schließen lässt, dass die Polyurie durch Wasserdiurese und nicht durch osmotische Diurese verursacht wurde. Im Stadium der Euhydration lag die Osmolarität der Nierenpapille deutlich unter den Werten der Wildtypkontrollen und zeigte auch nach Wasserentzug keinen nennenswerten Anstieg (Akizuki et al., 2001). Nach einem 24-stündigen Wasserentzug waren die KOs außerdem lethargisch und hatten 27 % an Körpergewicht verloren, wohingegen die Kontrollen nur um 12 % abnahmen. Die intraperitoneale Injektion von Vasopressin führte zu keinem bemerkenswerten Anstieg der Urinosmolarität in den ClC-K1 Mäuse. Bei ClC-K1 $+/+$ und $+/-$ Mäuse erhöhte sie sich jedoch um etwa das Dreifache (Matsumura et al., 1999). Eine weitere Forschungsgruppe konnte zeigen, dass im dünnen aufsteigenden Teil der Henle-Schleife der ClC-K1 $-/-$ Tiere kein Chloridtransport mehr stattfand (Liu et al., 2002). Diese Ergebnisse zeigten, dass ClC-K1 für die Aufkonzentrierung des Urins eine Rolle spielt und dass ein Funktionsverlust des ClC-K1 zu einem renalen Diabetes insipidus führt (Matsumura et al., 1999). Die Bedeutung des ClC-Ka/1 Kanals liegt somit in der aktiven Rückresorption von NaCl im dünnen aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, wo er zu einer hohen Osmolarität der inneren Medulla beiträgt. Dadurch ist ClC-Ka/1 ein wichtiger Bestandteil der Aufrechterhaltung des osmotischen Gradienten zwischen Cortex und Medulla (Akizuki et al., 2001).

Obwohl bisher keine humane Erkrankung bekannt ist, die durch einen Funktionsverlust des ClC-Ka verursacht wird, gibt es genetische Varianten des Clcnka Gens, die mit einer erhöhten Plasminreninaktivität und einem Blutdruckanstieg nach Salzgabe einhergehen. ClC-Ka/1 könnte demnach neben seiner Rolle bei der Urinkonzentrierung also auch eine Bedeutung bei der Entstehung einer Salz-sensitiven Hypertonie

zukommen (Barlassina et al., 2007).

CIC-Kb/2 ist im TAL und im DCT in allen Zellen in der basolateralen Membran exprimiert und erlaubt dort den Austritt von Chloridionen aus den Tubulusepithelzellen in die Blutbahn. Zusammen mit den apikalen Transportern NKCC2 und NCC ist er so an der transzellulären Chloridresorption beteiligt (Schnermann and Sayegh, 1998).

Durch die Entdeckung des Zusammenhangs zwischen einer „loss-of-function“ Mutationen des *Clcnkb* Gens, das für den CIC-Kb Kanal kodiert, und einer humanen Salzverlusttubulopathie, genannt Bartter Syndrom Typ III, deutete sich die Relevanz des CIC-Kb Kanals für die Nierenfunktion an. Betroffene Patienten zeigen eine äußerst heterogene und eher milde Symptomatik, die meist mit Polyurie und hypokaliämischer Alkalose einhergeht (Simon et al., 1997). Häufig überlappen die Symptome mit anderen Bartter Typen oder auch dem Gitelman Syndrom, einer weiteren Salzverlusttubulopathie (näheres zur Klinik von Bartter III und Gitelman Syndrom unter Punkt 3.1.4 bzw. 3.2). Diese Heterogenität der Klinik bei Bartter III macht es schwer, die Konsequenzen eines Funktionsverlustes von CIC-Kb und damit seine Beteiligung an der Nierenfunktion zu erfassen. Ein Funktionsverlust des CIC-Kb scheint sowohl die Resorption im TAL als auch im DCT in noch unbekanntem Maß zu beeinträchtigen (Jeck et al., 2000).

Da bisher jedoch kein Modell einer CIC-K2 defizienten Maus verfügbar ist, lässt sich keine Aussage bezüglich der quantitativen Beteiligung des CIC-K2 Kanals an der NaCl-Rückresorption oder auch an der Regulation der Nierenfunktion treffen. Die in dieser Arbeit untersuchte Mauslinie mit einer Nullmutation des *Clcnk2* Gens bietet zum ersten Mal Einblicke in die Aufgaben und Bedeutung dieses Anionenkanals an der Gesamtresorptionsleistung der Niere und die damit verbundenen klinischen Symptome, die durch den Funktionsverlust des CIC-K2 entstehen. Somit kann nun erstmals ein klarer Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp in einer Mauslinie untersucht werden, die das humane Bartter Syndrom Typ III nachbilden soll.

Im Gegensatz zum Funktionsverlust bei Bartter III sind genetische Varianten des *Clcnkb*, die zu einer erhöhten Aktivität des Kanals führen, mit einer Salz-sensitiven Hypertonie assoziiert (Jeck et al., 2004a, Jeck et al., 2004b). Ein möglicher Zusammenhang zwischen Salz-sensitivem Bluthochdruck und dem CIC-K2 Kanal wurde von Castrop et al. im Jahr 2000 postuliert. Sie zeigten eine Hochregulation des CIC-K2 in der inneren Medulla Salz-sensitiver Dahl-Ratten (Castrop et al., 2000).

2.5 Die Untereinheit Barttin und ihre Bedeutung

Essenziell für die Funktion der ClC-K Kanäle ist die β -Untereinheit Barttin (Estevez et al., 2001, Scholl et al., 2006, Waldegger et al., 2002). Sie besteht aus 320 Aminosäuren und enthält zwei Transmembrandomänen gefolgt von einem großen Carboxy-Terminus. Wie genau der Kanal und die Untereinheit interagieren ist nicht bekannt, vermutlich bindet Barttin aber an die Transmembranhelices B und J des Kanals (Tajima et al., 2007). Barttin wird, wie die beiden ClC-K Kanäle, in der Niere vom dünnen aufsteigenden Teil der Henle-Schleife bis zum Sammelrohr exprimiert. Es ist das Produkt des BSND Gens, dessen Mutation zum sogenannten Bartter Syndrom Typ IV führt (Hayama et al., 2003, Janssen et al., 2009). Der klinische Phänotyp dieser Erkrankung wird unter Punkt 3.1.5 Bartter IV erörtert.

Vor der Entdeckung von Barttin war mehrfach versucht worden, die ClC-K Isoformen zu untersuchen, doch konnte kein funktionsfähiger Kanal erzeugt werden. Nach der Beschreibung der Untereinheit Barttin und als nun ClC-K Kanäle zusammen mit Barttin in *Xenopus-laevis*-Oocyten ko-exprimiert wurden, erhielt man leitfähige Anionenkanäle (Kieferle et al., 1994). Die einzige Ausnahme hiervon bildet der ClCK1 von Maus und Ratte. Er ist auch ohne Barttin funktionsfähig, allerdings mit einer herabgesetzten Aktivität (Uchida et al., 1993, Waldegger and Jentsch, 2000).

Untersuchungen auf subzellulärer Ebene in MDCK (Madin Darby canine kidney) Zellen zeigen mittlerweile, dass ohne Barttin ClC-K2 im Golgi-Apparat und ClC-K1 sowie ClC-Kb im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert bleiben (Hayama et al., 2003). Erst das Vorhandensein von Barttin und seine Bindung an die Transmembrandomäne des Kanals ermöglichen den Einbau der Kanäle in die Oberflächenmembran (Scholl et al., 2006). Auch die Polarität des Einbaus wird durch Barttin gesteuert, indem es für eine Lokalisation in der basolateralen Zellmembran sorgt (Janssen et al., 2009). Außerdem stimuliert Barttin die Glykosylierung der ClC-K Kanäle und schützt sie so vor dem Abbau, was eine Erklärung für die höhere Stabilität der Kanäle nach Bindung an Barttin sein könnte (Hayama et al., 2003).

Über die Bedeutung von Barttin in der Stria vascularis des Ohrs gibt ein Vergleich zwischen Bartter III und IV Aufschluss. Während Mutationen des *Clcnkb* eine Salzverlusttubulopathie ohne Taubheit verursachen, weil der ClC-Ka kompensatorisch wirksam wird, führt ein Verlust von Barttin zum Funktionsverlust beider Kanäle und damit zur Innenohrtaubheit der Bartter IV Patienten (Birkenhager et al., 2001).

Die Bedeutung der Barttin-Untereinheit für die Nierenfunktion wurde deutlich in Mäusen, die kein Barttin exprimierten. Sie waren ebenfalls taub, litten außerdem an schwerer Dehydration und starben nur wenige Tage nach der Geburt (Rickheit et al., 2008).

2.6 Die Regulation der ClC-K Kanäle

Über die Regulation von ClC-K1, ClC-K2 und Barttin ist nur wenig bekannt. Bezüglich des ClC-K1 konnte in Ratten eine Hochregulation nach Wasserentzug und eine Herabregulation nach Furosemid-Gabe nachgewiesen werden (Uchida et al., 1993, Vandewalle et al., 1997, Wolf et al., 2001). In Gewebe-spezifischen ACE KO-Mäusen war die ClC-K1 Expression auf etwa 6 % der Wildtypkontrollen verringert (Klein et al., 2002). Diese Ergebnisse lassen auf eine Regulation des ClC-K1 durch eine Abnahme des Intrazellulärvolumens, durch eine Hemmung des Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter NKCC2 und durch das lokale RAAS schließen (Kramer et al., 2008).

Anders als ClC-K1 zeigt ClC-K2 keine Veränderung der Expression unter Dehydration (Vandewalle et al., 1997). Durch die Applikation von Furosemid wird ClC-K2 jedoch stärker im TAL exprimiert und unter einer Niedrigsalzdiät herunterreguliert (Vitzthum et al., 2002). Nach der intravenösen Verabreichung von Enterotoxinen konnte bei Mäusen eine starke Diurese und Natriurese nachgewiesen werden, die möglicherweise durch eine verringerte Expression von ClC-K2 verursacht wurde (Carrithers et al., 2004). ClC-K2 wird also vermutlich durch den Volumenstatus und Salzgehalt reguliert. Außerdem spielt dabei wohl auch die Blockade des NKCC2 und intrazelluläres zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) eine Rolle (Kramer et al., 2008).

Auf zellulärer Ebene wird die Aktivität der ClC-K Kanäle durch eine erhöhte extrazelluläre Calciumkonzentration gesteigert, indem Calcium direkt an die I-J-Schleife des Kanalproteins bindet (siehe Abbildung 4) (Gradogna et al., 2010, Gradogna et al., 2012). Des Weiteren sind ClC-K Kanäle extrem sensitiv für Änderungen der extrazellulären Protonenkonzentration. Bei einem sauren pH-Wert unter 6,0 ist der Kanal fast vollständig geschlossen, während ein basischer pH-Wert die Aktivität deutlich steigert (L'Hoste et al., 2013, Zaika et al., 2016). Diese Sensitivität hängt mit der Bindung von H^+ -Ionen an einen Histidinrest in Position 497 am Beginn der α -Helix Q zusammen (siehe Abbildung 4) (Gradogna et al., 2010). Die Bedeutung dieser Regulationsmöglichkeiten ist unklar, da unter physiologischen Bedingungen der Calciumgehalt und auch der pH-Wert in engen Bereichen reguliert werden. Andererseits

könnte sich eine mutationsbedingte veränderte Sensitivität für Protonen und extrazelluläres Calcium auf den Phänotyp der Bartter Patienten auswirken (Andrini et al., 2014).

3. Erbliche Salzverlusttubulopathien

Autosomal rezessiv vererbte Salzverlusttubulopathien mit Hypokaliämie, metabolischer Alkalose und sekundärem Hyperaldosteronismus werden seit ihrer Erstbeschreibung durch Bartter et al. unter dem Begriff der Bartter Syndrome zusammengefasst (Bartter et al., 1962). Allen gemeinsam ist die Mutation eines Gens, die zum Funktionsverlust eines Transporters, Kanals oder einer Kanaluntereinheit führt und somit eine Störung der Elektrolyt- und Wasserhomöostase bewirkt.

Bezüglich der Einteilung der Bartter Syndrome in ihre Subtypen gibt es zwei verschiedene Herangehensweisen: zum einen besteht die Möglichkeit sie nach ihrem erstmaligen Auftreten in antenatales und klassisches Bartter Syndrom zu unterteilen; zum anderen existiert eine genetisch basierte Nomenklatur, bei der die Subtypen nach der ihnen zugrundeliegenden Mutation und der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert werden. Hierbei ergibt sich folgende Nomenklatur: als Bartter I werden Mutationen des SLC12A1 Gens (NKCC2) bezeichnet (Simon et al., 1996a), als Bartter II Mutation des KCNJ1 (ROMK) (Simon et al., 1996b), als Bartter III Mutation des CLCNKB (Simon et al., 1997), als Bartter IV Mutationen des BSND (Barttin) oder von Clcnka & Clcnkb (Birkenhager et al., 2001) und als Bartter V solche Mutationen, die das CASR Gen betreffen (Watanabe et al., 2002). Im Folgenden soll nun aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit die genetische Nomenklatur verwendet werden.

Die fünf verschiedenen Bartter Syndrome unterscheiden sich teils deutlich in der Art und Schwere ihrer klinischen Ausprägung. Das wird darauf zurückgeführt, dass je nach Typ die Funktion eines anderen Nephronabschnittes eingeschränkt oder ganz eliminiert ist. Die große Heterogenität der Symptomatik macht eine Diagnose rein aufgrund der Klinik äußerst schwierig. Teilweise zeigen Bartter Patienten außerdem ein klinisches Erscheinungsbild, das eher dem des Gitelman Syndroms, einer anderen Salzverlusttubulopathie, entspricht (Seyberth and Schlingmann, 2011). Über die Häufigkeit der Bartter Erkrankung gibt es nur wenige genaue Zahlen. Schätzungen belaufen sich zwischen 1 : 50 000 und 1 : 100 000 für die Inzidenz. Die Prävalenz liegt

bei etwa 1 : 830 000.

Durch die Charakterisierung von Tiermodellen, die die verschiedenen Bartter Typen mit dem jeweiligen Funktionsverlust des Transporters/Kanals nachbilden, konnte die Bedeutung dieser Transporter/Kanäle für das komplexe Zusammenspiel der Resorptionsvorgänge der Niere sowie die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp der Bartter Erkrankung schon teilweise erfasst werden (Takahashi et al., 2000, Lorenz et al., 2002, Schultheis et al., 1998, Matsumura et al., 1999).

3.1 Das Bartter Syndrom

3.1.1 Die Pathogenese des Bartter Syndroms

Bezüglich der Pathogenese der verschiedenen Bartter Typen ist besonders der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife (TAL) von Bedeutung, da sich hier die Transporter und Kanäle befinden, für die die betroffenen Gene kodieren (Pape et al., 2014).

Erkrankungen bei denen der TAL betroffen ist, führen zu einem starken Salz- und Wasserverlust, vergleichbar mit dem Einsatz eines Schleifendiuretikums (Seyberth, 2008). Die Resorptionsfunktion von NaCl und Wasser ist deshalb so stark betroffen, weil der TAL durch die aktive transepitheliale NaCl-Aufnahme an der Generierung des hyperosmotischen Interstitiums und damit am Gegenstromprinzip beteiligt ist. Ein funktionsloser oder funktionsbeeinträchtigter TAL führt dazu, dass neben Elektrolyten auch weniger Wasser zurückgewonnen wird (siehe 1.4 Die Wasserrückresorption in der Niere im Zustand der Antidiurese). Der Funktionsverlust des NKCC2 bei Bartter I verhindert, dass in diesem Segment NaCl aufgenommen wird (Simon et al., 1996a). Da die Funktion des NKCC2 von Kalium abhängt, das durch ROMK aus der Zelle in das Tubuluslumen wieder recycelt wird, ist durch die fehlende Aktivität der ROMK bei Bartter II die NaCl-Resorption ebenfalls gestört (Simon et al., 1996b). Das gleiche gilt auch für Bartter III und IV, bei denen durch den Verlust von ClC-Kb bzw. Barttin die basolaterale Chloridleitfähigkeit eingeschränkt bzw. eliminiert ist (Simon et al., 1997, Birkenhager et al., 2001). Durch die Beeinträchtigung der NaCl-Resorption wird außerdem auch nur ein reduziertes transepitheliales Potenzial aufgebaut, sodass die parazelluläre Aufnahme von Kationen wie Magnesium und Calcium ebenfalls herabgesetzt ist (Ellison, 2000). Der erhöhte Gehalt von NaCl und Wasser im distalen Nephron führt dort zu einer kompensatorischen Erhöhung der NaCl- und Wasserrückresorption im Sammelrohr. Dies geschieht indem, durch den Volumenverlust aufgrund der Polyurie, das RAAS aktiviert (siehe 1.7.1 Das Renin-

Angiotensin-Aldosteron-System) und vermehrt ADH freigesetzt wird. Das am Ende der RAAS-Kaskade vermehrt gebildete AngII stimuliert die Ausschüttung von Aldosteron und ADH. Letzteres bewirkt in den Sammelrohren eine Zunahme der Wasserpermeabilität der Hauptzellen dadurch, dass vermehrt Aquaporin 2 Kanäle eingebaut werden. Aldosteron fördert die Natriumresorption im distalen Nephron, wo es die apikalen ENaC-Kanäle, die basolaterale Natrium-Kalium-ATPase und die K⁺-Sekretion stimuliert. Die verstärkte Natriumresorption, auf Kosten einer gesteigerten H⁺- und K⁺-Sekretion, kann die verminderte Resorption im TAL jedoch nur teilweise wettmachen. Aufgrund des herabgesetzten osmotischen Gradienten in der Medulla, trägt auch die verstärkte Wasserpermeabilität des Sammelrohrs nur bedingt zu einer vermehrten Wasserrückgewinnung bei (Schnermann and Sayegh, 1998). Es entsteht eine Polyurie mit erhöhter fraktioneller Exkretion von verschiedenen Elektrolyten. Der Verlust an H⁺- und K⁺-Ionen mit dem Urin führt zum Auftreten der für die Bartter Patienten typischen hypokaliämischen Alkalose (Bartter, 1977).

Darüber hinaus handelt es sich hier um „prä“- Macula densa Erkrankungen, bei denen die Mutation auch in Zellen der Macula densa zu finden ist, weil es sich bei diesen Zellen um spezialisierte Zellen des TAL handelt. Da die Macula densa Zellen das gleiche Repertoire an Ionenkanälen für ihre Sensorfunktion nutzen, kann dies zu einer Fehlfunktion der renalen Autoregulation führen (siehe 1.7.2 Die renale Autoregulation) (Schnermann, 1998). Die defekte Sensorfunktion der MD zieht einen Anstieg der Produktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) nach sich (Peti-Peterdi and Harris, 2010). PGE₂ wiederum interagiert mit dem tubulo-glomerulären Feedback und steigert die GFR (Deng et al., 2004). Zusätzlich hemmt PGE₂ die Wirkung des Antidiuretischen Hormons (ADH) auf die Wasserresorption im Sammelrohr und aktiviert das RAAS, um die Rückresorption der Salze zu steigern. Dieser Effekt wird jedoch gleichzeitig wieder unwirksam gemacht, indem PGE₂ die Salzresorption im TAL und DCT zusätzlich zur genetischen Beeinträchtigung reduziert. Dadurch verstärkt PGE₂ den Wasser- und Elektrolytverlust nur weiter (Jeck et al., 2005). Die in der Folge erhöhte Ausscheidung von PGE₂ mit dem Urin ist ein charakteristisches Symptom der Bartter Patienten und wird als Nachweis für die Erkrankung in der klinischen Diagnostik herangezogen. Salzverlusttubulopathien der Bartter Gruppe werden deshalb auch als Hyperprostagandin E₂ Syndrom bezeichnet (Nusing and Seyberth, 2004). Des Weiteren führt PGE₂ zum Auftreten von Fieber, Erbrechen und Osteopenie (Seyberth and Schlingmann, 2011).

Eine schematische Übersicht über die Pathogenese des Bartter Syndroms liefern die Abbildungen 6 und 7.

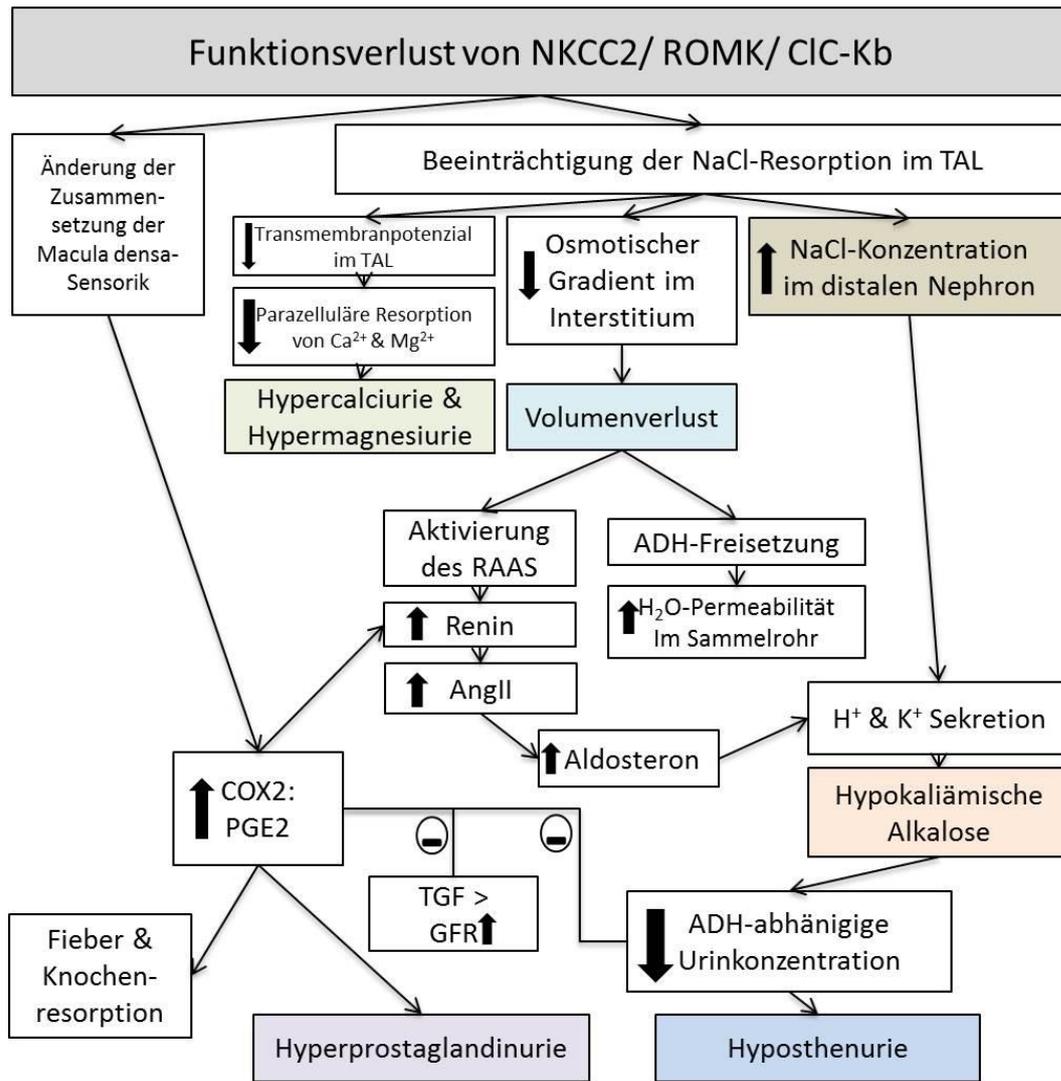


Abbildung 6 Übersicht über die Pathogenese bei Bartter I bis III und die daraus resultierenden Symptome.

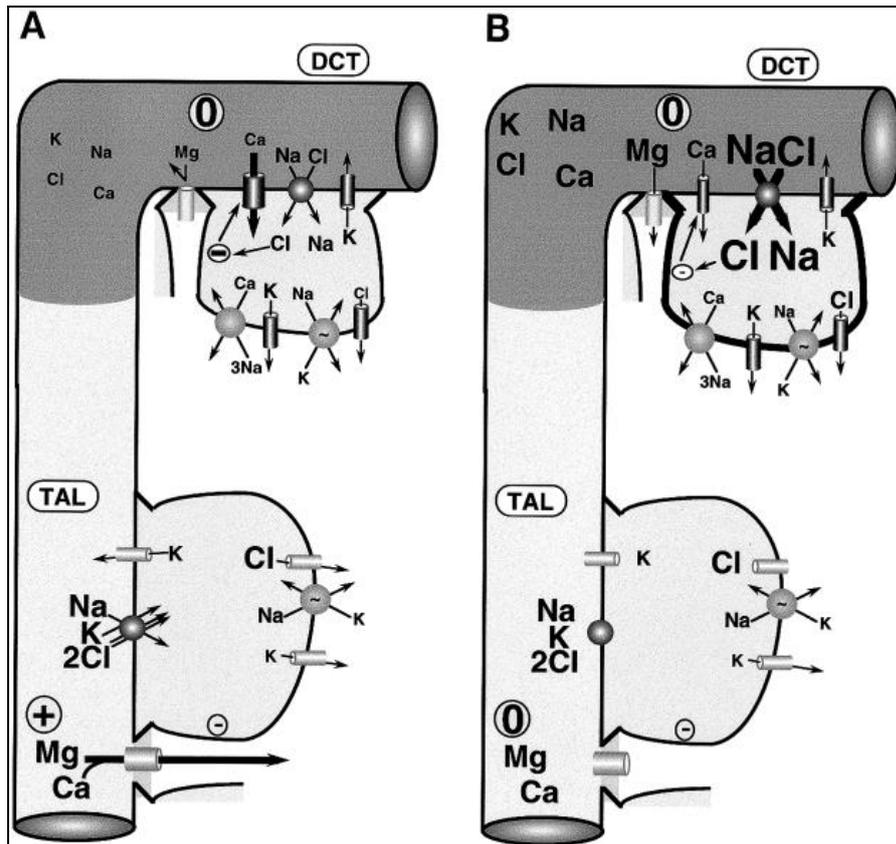


Abbildung 7 Pathogenese des Bartter Syndroms auf Zellebene. Jeweils eine Zelle des TAL und des DCT mit ihren Ionentransportern und -kanälen ist vergrößert dargestellt (entnommen aus Ellison, 2000). (A) zeigt die Resorptionsvorgänge in einem gesunden TAL bzw. DCT. (B) zeigt die Vorgänge beim Bartter Syndrom, wo der NaCl-Transport im TAL zum Erliegen gekommen ist. Damit sinkt das transepitheliale Potenzial und es findet keine Calcium- und Magnesiumresorption mehr statt. Durch den erhöhten luminalen Elektrolytgehalt kommt es außerdem zu einer Hypertrophie des nachgeschalteten DCT.

3.1.2 Bartter I

Das humane Bartter Syndrom Typ I resultiert aus einer Mutation des Gens SLC12A1, das für den Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter NKCC2 kodiert (Simon et al., 1996a). Sein Funktionsverlust im Bereich des TAL führt zu den für diese Erkrankung typischen Symptomen der massiven Polyurie, Hyperprostaglandinurie und hypokalämischen Alkalose. Der Volumenverlust durch die direkt nach der Geburt auftretende Polyurie kann so groß sein, dass eine lebensbedrohliche Dehydratation entsteht. Darüber hinaus macht sich die Polyurie auch schon *in utero* in Form eines maternalen Polyhydramnion bemerkbar, das zur Frühgeburtlichkeit führen kann. Bartter I wird deshalb auch als antenatales Bartter Syndrom bezeichnet. Fast alle Patienten entwickeln innerhalb der ersten Lebenswochen eine Nephrocalcinose, aufgrund einer

persistierenden Hypercalciurie (Peters et al., 2002). Dieser Phänotyp spiegelt die Symptome einer Langzeitbehandlung von Kindern mit Furosemid wieder, was nicht verwunderlich ist, da Furosemid selektiv den hier funktionslosen NKCC2 blockiert (Hufnagle et al., 1982, Simon et al., 1996a).

Ein Tiermodell des Bartter Syndroms Typ I wurde im Jahr 2000 von der Gruppe um Takahashi et al. erstmalig charakterisiert. Obwohl homozygote NKCC2 $-/-$ Tiere in der erwarteten Mendelschen Verteilung geboren wurden, zeigten sie schon einen Tag *post partum* einen deutlichen Volumenverlust (Hämatokrit 51 %, Wildtyp 37 %) und blieben in der Entwicklung zurück. Sieben Tage nach der Geburt hatte sich die Symptomatik der NKCC2 $-/-$ Tiere weiter verschlechtert, sodass nun zusätzlich noch eine Niereninsuffizienz, Hypokaliämie, metabolische Azidose und erhöhte Plasmareninkonzentration auftraten, was letztendlich zum Tod der Tiere noch vor dem Absetzen führte. Durch die Behandlung mit dem nichtsteroidalen Antiphlogistikum (NSAID) Indomethacin direkt nach der Geburt konnte dies bei 10 % der Tiere verhindert werden. Die überlebenden behandelten Tiere zeigten eine starke Polyurie, Hydronephrose, Hypokaliämie, Alkalose, Hypercalciurie und Proteinurie. Die Autoren konnten diesen Phänotyp in Wildtypmäusen nachbilden, die mit dem Schleifendiuretikum Furosemid, einem NKCC2-Blocker, behandelt wurden. Die Ausprägung der Symptomatik der NKCC2 $-/-$ Mäuse entsprach weitestgehend der Klinik der Bartter I Patienten und Unterschiede waren eher quantitativer als qualitativer Natur. So zeigten die Mäuse eine stärker ausgeprägte Hydronephrose, welche aber dadurch zu erklären ist, dass die murine Niere im Vergleich zu humanen nach der Geburt noch deutlich unreifer ist und dass sich damit auch eine *post partum* auftretende Hydronephrose stärker ausbildet. Die hohe Sterblichkeit der NKCC2 $-/-$ Jungtiere war verursacht durch eine starke Dehydration infolge der Unterversorgung mit Milch, um die sie mit ihren Wurfgeschwistern konkurrierten (Takahashi et al., 2000). Eine ähnliche Problematik tritt auch bei am Bartter I Syndrom leidenden Menschen auf, wenn eine adäquate Flüssigkeitsversorgung nach der Geburt nicht gewährleistet ist (Proesmans et al., 1985).

3.1.3 Bartter II

Eine Mutation des Gens KCNJ1 mit dem daraus resultierenden Funktionsverlust des Kalium-Kanals ROMK wird als Bartter Syndrom Typ II bezeichnet (Simon et al., 1996b). Betroffene Patienten zeigen weitestgehend Symptome, die mit denen des Bartter Typ I übereinstimmen, wie Polyurie, hypokaliämische Alkalose, Hypercalciurie

und Nephrocalcinose. Eine vorübergehende neonatale Hyperkaliämie, die später in eine Hypokaliämie übergeht, ist jedoch charakteristisch für diesen Bartter Typ. Dieses Phänomen resultiert aus dem Beitrag der ROMK zur distalen Kaliumausscheidung. Andere Kaliumkanäle scheinen postnatal im Bereich des CD kompensatorisch zu wirken und verursachen einen Wechsel von Hyperkaliämie zu Hypokaliämie (Peters et al., 2002). Auch Bartter II gehört zu den antenatalen Bartter Typen (Seyberth and Schlingmann, 2011).

Eine dem humanen Bartter II entsprechende ROMK defiziente Mauslinie wurde 2002 von Lorenz et al. beschrieben. ROMK $-/-$ Mäuse zeigten Hydronephrose, Entwicklungsstörungen, Polydipsie, Polyurie und ein Defizit in der Urinkonzentrationsfähigkeit. Die daraus entstehende Dehydration führte zum Tod von 95 % der Nullmutanten innerhalb der ersten drei Lebenswochen. Die überlebenden Tiere wiesen einen Hypertonus, eine deutlich reduzierte glomeruläre Filtrationsrate, Hypernatriämie, Hyperchlorämie, und eine Störung des tubuloglomerulären Feedback Mechanismus auf. Die deutliche Dehydration der ROMK $-/-$ Tiere war aufgrund der erhöhten Plasmanatrium- und -chloridwerte eher auf einen Verlust an Wasser als an NaCl zurückzuführen. Anders als bei von Bartter II betroffenen Menschen, zeigten die ROMK $-/-$ Mäuse keine metabolische Alkalose sondern eine Azidose (Lorenz et al., 2002).

Im Gegensatz zu NKCC2 defizienten Mäusen konnte hier durch die postnatale subkutane Applikation des NSAIDs Indomethacin oder von isotoner Kochsalzlösung keiner Steigerung der Überlebensrate erzielt werden (Takahashi et al., 2000). Verglichen mit NKCC2 $-/-$ Tieren zeigte sich ein etwas milderer Phänotyp, sodass davon auszugehen ist, dass ROMK eine im Vergleich zu NKCC2 weniger limitierende Rolle bei der Resorption von Salz zukam und dass trotz des Funktionsverlust der ROMK noch eine Restresorptionsrate im TAL aufrechterhalten werden konnte (Takahashi et al., 2000, Lorenz et al., 2002).

3.1.4 Bartter III

3.1.4.1 Die Klinik des Bartter III

Von Simon et al. wurde 1997 erstmals der Zusammenhang zwischen einem Subtyp des Bartter Syndroms mit den Symptomen einer hypokaliämischen Alkalose mit Salzverlust, Hypotonus, normalen Magnesiumwerten, Hyper-/Normocalciurie und verschiedenen Mutationen des Clcnkb Gens beschrieben. In der Folge werden

Erkrankungen mit einem Funktionsverlust des ClC-Kb Kanals, verursacht durch eine Mutation des Clcnkb Gens, als Bartter Syndrom Typ III oder auch als klassisches Bartter Syndrom bezeichnet (Simon et al., 1997).

Es handelt sich dabei ebenfalls um eine autosomal rezessiv vererbte Salzverlusttubulopathie. Anders als andere Bartter Typen macht sich dieses Bartter Syndrom nicht schon pränatal bemerkbar, sondern wird meist erst in der Kindheit klinisch relevant. Als charakteristisch für Bartter III werden heute eine geringgradige Polyurie, eine hyperkaliämische Alkalose, eine Hypochlorämie, eine Hypotonie, sowie Entwicklungs- und Wachstumsstörungen betrachtet. Im Gegensatz zu den anderen Bartter Typen handelt es sich wie oben erwähnt nicht um eine antenatale Form und es entwickelt sich keine Nephrocalcinose (Kleta and Bockenhauer, 2006, Simon et al., 1997, Seyberth and Schlingmann, 2011).

Im Vergleich zu den übrigen Bartter Syndromen entsteht durch das klassische Bartter Syndrom meist eine sehr milde Symptomatik, gleichzeitig zeigt dieser Typ aber auch die größte Heterogenität in der phänotypischen Ausprägung. Dies verkompliziert die Diagnosestellung in diesem Fall, da teilweise eine Klinik vorgefunden wird, die eher dem Gitelman Syndrom, also einem Funktionsverlust von NCC im DCT, entspricht (Brochard et al., 2009).

Im Gegensatz zu fast allen anderen Bartter Typen ist bis heute kein Tiermodell des Bartter III in Form einer ClC-K2 defiziente Mauslinie verfügbar, die einen Aufschluss über die Konsequenzen des fehlenden ClC-Kb/2 Kanals und damit auch über seine physiologische Bedeutung geben kann (Andrini et al., 2015).

3.1.4.2 Bekannte Mutationen des Clcnkb Gens

Simon et al. identifizierten als erstes eine Mutation des Clcnkb Gens als Ursache für das Bartter Syndrom Typ III (Simon et al., 1997). Bis heute sind über 50 Mutationen im Clcnkb Gen in der Human Gene Mutation Database aufgelistet (www.hgmd.cf.ac.uk). Darunter sind kleine und große Deletionen, kleine Insertionen, „missense“- und „nonsense“-Mutationen und „splice site“-Mutationen. Für Bartter III ist häufig eine Deletion des kompletten Clcnkb Gens zu finden (Brochard et al., 2009, Jeck et al., 2000, Konrad et al., 2000). Die über 50 Punktmutationen, sowohl „missense“- als auch „nonsense“-Mutationen, verteilen sich über das gesamte Protein, ohne dass sich ein Muster oder gar Hotspots ergeben. In der alpha-Helix ist in 60 % der Fälle der Ort der Mutation, in 20 % die Helixverbindung und in weiteren 20 % ist der zytoplasmatische

Anteil des Proteins betroffen (Andrini et al., 2015). Eine Übersicht über die Verteilung der bekannten Mutationen entlang des Proteins ist in Abbildung 8 zu finden.

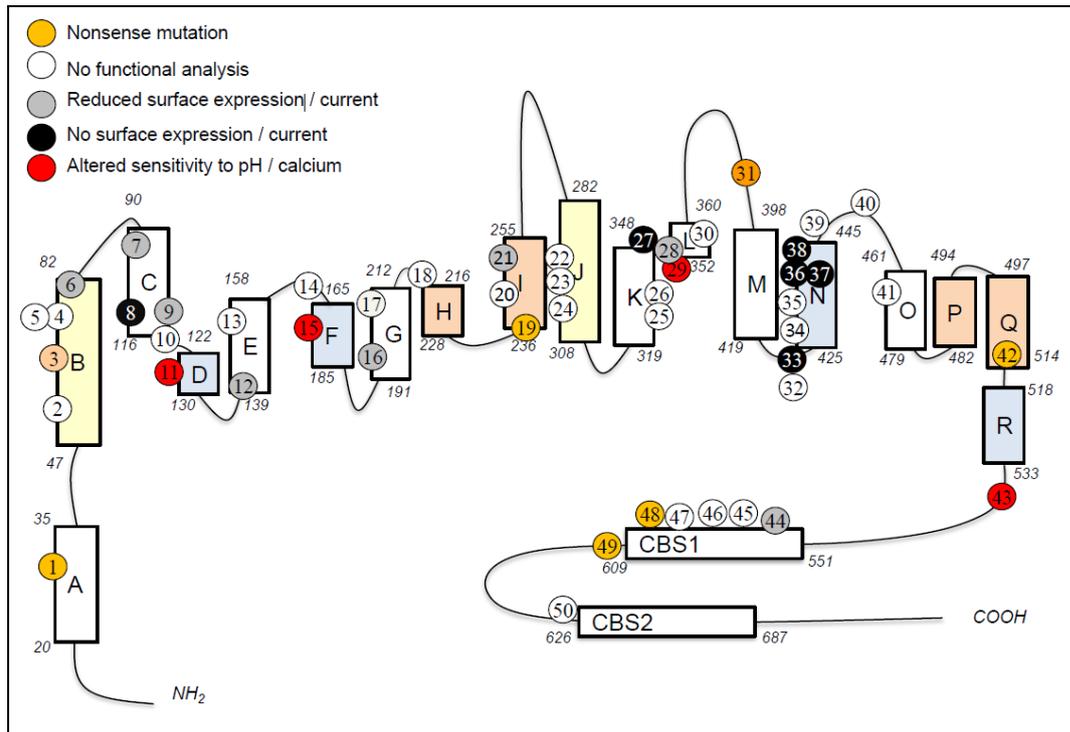


Abbildung 8 Bekannte Mutationen des CIC-Kb Kanals, die mit Bartter III assoziiert sind (entnommen aus Andrini et al., 2015). Die Lokalisation der Mutationen ist an einem Modell des Proteins dargestellt, indem Rechtecke die α -Helices abbilden. Der untere Teil des Modells liegt intrazellulär, der obere extrazellulär. Großbuchstaben stehen für die Helices, CBS für die Cystation- β -Synthase Domäne. Jeder Kreis steht für eine bekannte Mutation.

Einige Mutationen wurden mittlerweile schon von mehreren Gruppen beschrieben und scheinen sich in bestimmten Ländern zu häufen (Lee et al., 2012, Garcia-Nieto et al., 2006). Aufgrund technischer Probleme bei der Expression im heterologen System wurden bislang nur etwa 20 Mutationen funktionell untersucht. Zu den beobachteten Veränderungen zählten eine reduzierte oder ganz aufgehobene Aktivität des Kanals, reduzierte oder keine Oberflächenexpression, Veränderung der Sensitivität gegenüber dem pH-Wert und extrazellulärem Calcium sowie komplette oder teilweise Undurchlässigkeit (Andrini et al., 2015, Andrini et al., 2014). Die Klinik des Bartter Typ III, das durch einen mutationsbedingten Funktionsverlust des CIC-Kb verursacht wird, ist unter Punkt 3.1.4.1 Die Klinik des Bartter III bereits näher beschrieben worden.

Zurzeit ist nur eine Mutation des Clcnkb bekannt, die zu einer Steigerung der Funktion des Kanals führt („gain-of-function“ Mutation). Die Patienten präsentieren sich mit

einem essentiellen Hypertonus aufgrund der gesteigerten Salzresorption, sodass ein Einfluss des ClC-Kb auf die Langzeitregulation des Blutdrucks vermutet wird (Jeck et al., 2004a, Jeck et al., 2004b).

3.1.5 Bartter IV

Bei Patienten, die am Bartter Syndrom Typ IV leiden, liegt eine Mutation des BSND Gens vor. Dieses Gen kodiert für die akzessorische Untereinheit Barttin der ClC-K Kanäle. Ohne diese Untereinheit geht die Funktion beider ClC-K Kanäle verloren (Birkehager et al., 2001). Mittlerweile wird auch der gleichzeitige, genetisch bedingte Verlust von ClC-Ka und ClC-Kb zu Bartter IV gezählt, da dies zum gleichen Resultat führt wie ein Fehlen von Barttin. Die hochgradige Einschränkung der basolateralen Chloridleitfähigkeit im ALT, TAL und DCT der Niere und im Innenohr führt zu einer starken Beeinträchtigung der Urinkonzentrationsfähigkeit mit Hypochlorämie und Hypomagnesiämie und zu Innenohrtaubheit (Estevez et al., 2001). Die starke, schon sehr früh einsetzende Polyurie des Fetus resultiert in einem maternalen Polyhydramnion und Frühgeburtslichkeit des Kindes. Letztendlich kommt es bei diesem Bartter Typ zum chronischen Nierenversagen. Damit zeigen Bartter IV Patienten den schwersten und gleichzeitig auch eindeutigsten Phänotyp (Birkehager et al., 2001, Kramer et al., 2008).

Auch für Bartter IV wurde von Rickheit et al. 2008 ein Mausmodell charakterisiert. Wie unter Punkt 2.5 Die Untereinheit Barttin und ihre Bedeutung erwähnt, zeigten die Barttin -/- Mäuse alle charakteristischen Symptome des Bartter IV einschließlich der Innenohrtaubheit. Die hochgradige Dehydration der KOs war so stark, dass sie zum Tod aller Jungtiere nur wenige Tage nach der Geburt führte (Rickheit et al., 2008).

3.1.6 Bartter V

„Gain-of-function“-Mutationen des Calcium-Sensor-Rezeptors CaSR führen zum autosomal dominanten Bartter Syndrom Typ V. Kennzeichnende Symptome dieses Typs sind Hypocalciämie, Hypomagnesiämie und eine unterdrückte Parathyroid-Hormon Wirkung (Hannan and Thakker, 2013, Al Shibli and Narchi, 2015).

Der Calcium-Sensor-Rezeptor CaSR ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der die Sekretion des Parathyroidhormons reguliert. Er wird in einer Reihe von Geweben, darunter auch die Niere, exprimiert und durch hohe extrazelluläre Calciumkonzentrationen aktiviert. Daraufhin hemmt er die apikale ROMK, wodurch NaCl, Calcium und Magnesium mit dem Urin verloren gehen. Die „gain-of-function“-

Mutationen bei Bartter V führen dazu, dass der Rezeptor auch schon durch einen physiologischen Calciumgehalt im Urin aktiviert wird. Es entsteht ein Bartter-ähnlicher renaler Phänotyp mit Polyurie, Hypomagnesiämie und Hypocalciämie (Hannan and Thakker, 2013).

3.2 Das Gitelman Syndrom

Mutationen des Gens SLC12A3, das für den Natrium-Chlorid-Cotransporter NCC im DCT kodiert, verursachen das Gitelman Syndrom. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine rezessiv vererbte Salzverlusttubulopathie (Simon et al., 1996c).

3.2.1 Die Pathogenese des Gitelman Syndroms

Der Nephronabschnitt, der für die Pathogenese des Gitelman Syndroms von Bedeutung ist, ist die Pars convoluta des distalen Tubulus. Wie in 1.6 Die Pars convoluta des distalen Tubulus: Funktion und Ionentransporter erwähnt, ist hier der betroffene Natrium-Chlorid-Cotransporter NCC an der apikalen Zellmembran exprimiert. Sein Funktionsverlust unterbindet die Rückgewinnung von NaCl im DCT, der jedoch mit etwa 10 % der Gesamtresorption nur einen geringen Anteil an der NaCl-Rückgewinnung hat. Dennoch steigt die NaCl-Konzentration im distalen Nephron an und es kommt, wie beim Bartter Syndrom auch, zu einer Aktivierung des RAAS aufgrund des Volumenverlusts und zu einer reflektorischen Erhöhung der K^+ - und H^+ -Sekretion (siehe Abbildung 1).

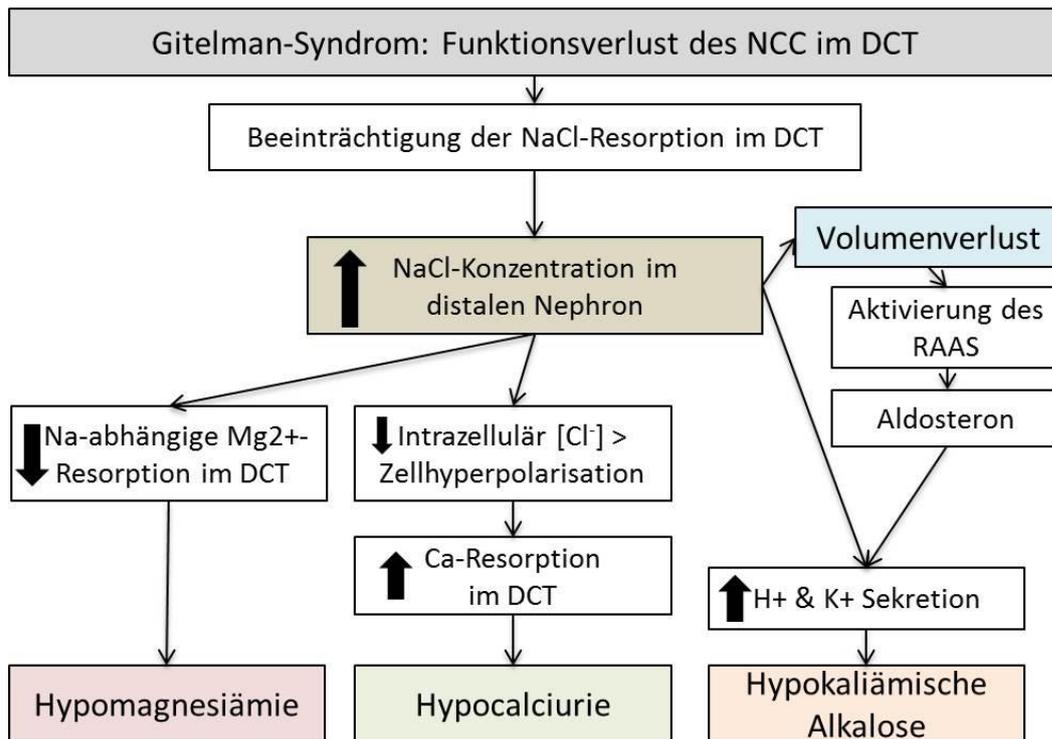


Abbildung 9 Übersicht der Pathogenese des Gitelman Syndroms und der daraus resultierenden Symptome.

Eine intakte DCT-Funktion scheint allerdings von umso größerer Bedeutung für den renalen Magnesium- und Calciumstoffwechsel zu sein. Durch die fehlende NCC-Aktivität sinkt der intrazelluläre Chloridspiegel und die Zelle wird hyperpolarisiert. Das treibt einerseits die transzelluläre Resorption von Calcium an, andererseits aktiviert es die ENaC-Kanäle im DCT2. Zusätzlich führt die Abwesenheit eines elektroneutralen Natriumtransports in diesem Aldosteron-sensitiven Epithel, zu einem Anstieg der transepithelialen Spannung. Dadurch wird nun Magnesium in den Tubulus sezerniert, statt resorbiert und geht so dem Organismus verloren (siehe Abbildung 10) (Ellison, 2000).

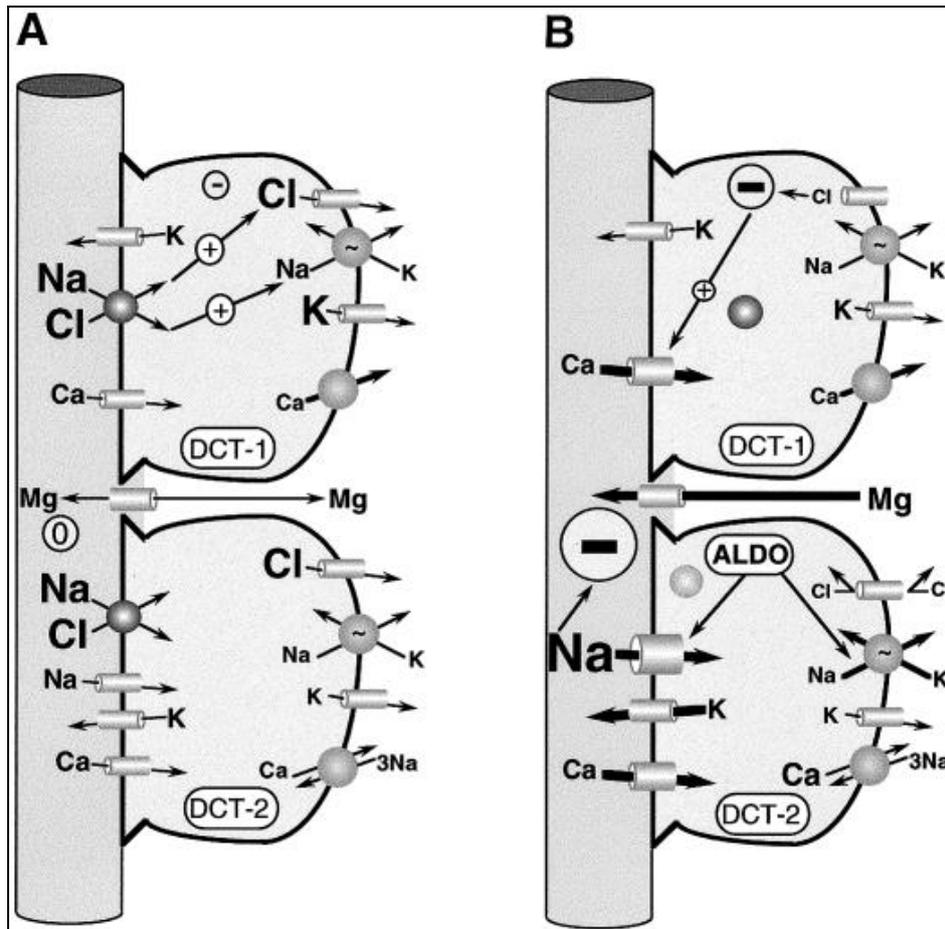


Abbildung 10 Pathogenese des Gitelman Syndroms auf Zellebene. Jeweils eine Zelle des DCT1 und DCT2 ist vergrößert dargestellt (entnommen aus Ellison, 2000).

3.2.2 Die Klinik des Gitelman-Syndroms

Anfangs wurde das Gitelman Syndrom als milde Salzverlusttubulopathie betrachtet, die sich erstmalig in der Kindheit oder im jungen Erwachsenenalter manifestiert. Die Symptome schließen geringgradige Polyurie, hypokaliämische Alkalose, Muskelschwäche, Müdigkeit und ein Verlangen nach Salz ein. Auch eine erhöhte muskuläre Erregbarkeit, die in Krämpfen und Tetanie mündet, tritt auf. Häufig wird der Befund als Zufallsdiagnose gestellt, wenn Kinder oder Jugendliche aufgrund einer Wachstumsstörung untersucht werden. Pathognomonisch für das Gitelman Syndrom sind eine erhöhte Ausscheidung von Calcium mit dem Urin und ein verringerter Magnesiumgehalt im Plasma. Die Hypomagnesiämie liefert auch die Erklärung für die oben beschriebenen häufig beobachteten Symptome (Kleta and Bockenbauer, 2006, Seyberth and Schlingmann, 2011).

Auch für das Gitelman Syndrom ist bereits ein Tiermodell vorhanden. Die von

Schultheis et al. 1998 generierten NCC Knockout Mäuse waren augenscheinlich gesund und zeigten weder Veränderungen des Säure-Basen-Haushaltes noch der Plasmaelektrolytwerte oder des Blutdrucks. Auch die Serumaldosteronkonzentration glich der der Wildtypkontrollen. Allerdings waren die Renin mRNA Level in der Niere der NCC $-/-$ Tiere erhöht und sie litten an der für das Gitelman Syndrom typischen Hypomagnesiämie und Hypocalciurie (Schultheis et al., 1998).

In diesem Mausmodell wird deutlich, dass sich eine Störung im Bereich des DCT, wie eingangs erwähnt, weniger auf die Wasser- und NaCl-Homöostase auswirkt sondern, dass dadurch viel mehr der renale Stoffwechsel von Magnesium und Calcium beeinträchtigt ist. Auch zeigt es, dass NCC im DCT verglichen mit NKCC2 im TAL eine weniger wichtige Rolle für die Gesamtresorption von Wasser und NaCl in der Niere spielt (Seyberth and Schlingmann, 2011).

3.3 Die Behandlung der Salzverlusttubulopathien

Grundsätzlich ist bei der Behandlung von Patienten mit egal welcher Art von Salzverlusttubulopathie eine adäquate Supplementation mit Flüssigkeit/Wasser und Elektrolyten/Salz wichtig. Besonders die häufig auftretende Hypokaliämie sollte durch eine Kalium-reiche Ernährung oder die orale Gabe von Kaliumchlorid statt normalem Kochsalz (NaCl) ausgeglichen werden. Hierbei ist dafür Sorge zu tragen, dass die Patienten nicht an einer Muskelschwäche oder gar einer Herzrhythmusstörung leiden (Seyberth and Schlingmann, 2011). Je nach Klinik sollten auch Calcium oder Magnesium oral substituiert werden. Die geringe intestinale Toleranz muss bei der *per os* Gabe von Magnesium besonders beachtet werden (Peters et al., 2002, Knoers and Levtchenko, 2008). Sollte die Hypokaliämie trotz der Verabreichung von Kalium und Indomethacin weiterbestehen, kann eine Therapie mit RAAS-Blockern wie ACE-Hemmern, Angiotensin-Rezeptor-Blockern oder direkten Renininhibitoren versucht werden. Zu Beginn der Therapie sollte die Nierenfunktion und der Blutdruck immer wieder überprüft werden (Hene et al., 1987, van de Stolpe et al., 1987, Bell, 2009).

Ein pharmakologischer Therapieansatz ist die charakteristische Hyperprostaglandinurie. Die oben erwähnte Supplementation mit Salz und Wasser sollte immer von einer pharmakologischen Unterdrückung der erhöhten PGE₂-Synthese begleitet sein (Komhoff et al., 2005). Zur chronischen Therapie kommt meist Indomethacin, ein nicht selektiver Cox-Hemmer, zum Einsatz. Es bietet den Vorteil, dass unter gut eingestellter Dosierung meist keine Supplementation mit Kalium oder die Gabe von RAAS-Blockern

mehr nötig ist und dass es von Kindern sehr gut vertragen wird (Peters et al., 2002). Neben den positiven Effekten auf den Wasser- und Elektrolythaushalt verbessert Indomethacin außerdem auch die Entwicklung und das Wachstum der Patienten. Dieser Effekt ist bei Kindern innerhalb des ersten Behandlungsjahres am stärksten (Seidel et al., 1995, Liaw et al., 1999). Da die erhöhte PGE₂-Produktion auf eine Hochregulation der Cyclooxygenase 2 zurückzuführen ist, können auch selektive Cox2-Inhibitoren zum Einsatz kommen (Kleta and Bockenhauer, 2006, Nusing et al., 2001, Reinalter et al., 2002). Ein Wechsel zwischen den beiden Gruppen erfolgt häufig aufgrund von auftretenden Nebenwirkungen wie Übelkeit oder Magenblutungen unter Indomethacin (Bettinelli et al., 2007, Schachter et al., 1998). Die klinische Symptomatik bei gastrointestinalen Nebenwirkungen durch Cox-Blocker korreliert nicht mit dem tatsächlichen Ausmaß. Deshalb ist eine regelmäßige Untersuchung des Magendarmtrakts mittels Endoskopie wichtig. Um die Nebenwirkungen des Indomethacin abzuschwächen, können vor einem Wechseln zu einem Cox II-Inhibitor Gastroprotektiva wie Protonenpumpenblocker eingesetzt werden. In einigen klinischen Studien wurden genauso gute Ergebnisse mit dem Cox II-Hemmer Rofecoxib wie mit Indomethacin erzielt, ohne dass gastrointestinale Nebenwirkungen auftraten (Vaisbich et al., 2004). Allerdings ist bis heute nicht abschließend geklärt, welcher dieser Arzneistoffe am besten zur Therapie der Bartter und Gitelman Patienten geeignet ist.

Unter keinen Umständen sollten Diuretika egal welcher Gruppe eingesetzt werden, da sie den Wasser- und Elektrolytverlust noch zusätzlich verstärken und eventuell vorhandene Kompensationsmechanismen, die nicht aufgrund der Genetik beeinträchtigt sind, blockieren können. Dies führt besonders bei Kindern zu ernsthafter Dehydration. Vor allem sollten keine Kalium-sparenden Diuretika verabreicht werden, da sie einen plötzlichen Wechsel von Hypokaliämie zu Hyperkaliämie bewirken können (Kleta and Bockenhauer, 2006, Phillips et al., 2006, Chadha and Alon, 2009).

In Fällen die mit Entwicklungsstörungen und Kleinwüchsigkeit assoziiert sind und bei denen die Behandlung mit Indomethacin nicht zu einer Verbesserung der Problematik führt, werden Wachstumshormone verabreicht um diesen Defekt auszugleichen und das Wachstum weiter zu fördern (Bettinelli et al., 2007, Vaisbich et al., 2004).

3.4 Die Prognose bei Bartter & Gitelman Syndrom

Prognostisch besteht ein Unterschied zwischen Patienten mit Beeinträchtigung der Funktion der Henle Schleife und solchen, bei denen der DCT betroffen ist. Erstere

leiden nach der Geburt und auch in der Kindheit stark unter der Salzverlusttubulopathie. Mit zunehmendem Alter jedoch stabilisiert sich die Erkrankung zumeist bei Bartter I und II Patienten und die Medikation kann reduziert werden. Beeinträchtigungen der DCT-Leistung äußern sich postnatal und in der Kindheit nur in einer eher schwachen Symptomatik, jedoch ist hier der Verlauf progredient und die Behandlung muss im Laufe der Zeit intensiviert werden (Cruz et al., 2001). Die Prognose ist bei Hypokaliämie und Hypomagnesiämie schlechter, weil dadurch Herzrhythmusstörungen und eine Verlängerung der QT-Strecke auftreten. Beides erhöht bei Bartter Typ III und Gitelman Syndrom das Risiko des plötzlichen Herztodes (Scognamiglio et al., 2007, Malafrente et al., 2004). Deshalb sollten allgemein keine Medikamente verabreicht werden, die die QT-Strecke verlängern. Dazu gehören Makrolide, Antihistaminika, Antitussiva, Antimykotika, einige psychoaktive Substanzen und β 2-Agonisten (Therapeutics, 2010).

Bei allen Salzverlusttubulopathien kann es vornehmlich bei starker Polyurie oder Verweigerung der Behandlung zu einem Abfall der glomerulären Filtrationsrate und zum Nierenversagen kommen (Bettinelli et al., 2007). Bartter IV Patienten sind hiervon am häufigsten betroffen (Jeck et al., 2001). Nur eine kontinuierliche und engmaschige Überwachung der Nierenfunktion und eine gut angepasste Medikation schützen die Patienten vor der irreversiblen Schädigung ihrer lebenswichtigen Nieren (Reinalter et al., 2001).

3.5 Die Differenzialdiagnosen zu erblicher Salzverlusttubulopathie

Grundsätzlich sind sich die verschiedenen Bartter Syndrome in ihrer phänotypischen Ausprägung untereinander so ähnlich, dass die jeweiligen Subtypen eine naheliegende Differenzialdiagnose untereinander darstellen. Die einzige Ausnahme bildet hier wohl Bartter Typ IV, da hier als einziges eine Innenohrtaubheit auftritt. Auch die Symptome durch das Gitelman Syndrom überlappen stark mit denen der Bartter Patienten (Seyberth and Schlingmann, 2011). Eine genetische Analyse ist das Mittel der Wahl, um Klarheit bezüglich der Ursache der Erkrankung zu schaffen. Dennoch ist dieses Verfahren limitiert durch fehlende Mutations-Hotspots, hohe Kosten und die begrenzte Verfügbarkeit.

Eine wichtige Differenzialdiagnose zu einem Bartter Syndrom ist das sogenannte Pseudo-Bartter Syndrom. Obwohl hier klinisch fast das gleiche Bild entsteht wie bei Patienten mit „echtem“ Bartter Syndrom liegt keine genetische Erkrankung als Ursache

vor, sondern die Symptomatik entsteht aufgrund eines Abusus von Diuretika oder Laxantien oder häufigem Erbrechen. Dies äußert sich ebenfalls in hypokaliämischer Alkalose, Salzverlust und sekundärem Hyperaldosteronismus. Das Schleifendiuretikum Furosemid blockiert beispielsweise den apikalen Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter NKCC2 im TAL und sorgt so für die gleiche Symptomatik, die auch Bartter I Patienten zeigen. Der Abusus des Diuretikums führt ebenso zu einer hypokaliämischen Alkalose und anderen Symptomen, wie es der genetische Funktionsverlust des NKCC2 tut. Der Nachweis von Diuretika im Urin ist hier beweisend für die Krankheit. Besonders häufig tritt das Pseudo-Bartter-Syndrom bei jungen Frauen mit psychogener Essstörung auf (Matsunoshita et al., 2016, Kuhlmann et al., 2008).

Eine dem Bartter Syndrom ebenfalls sehr ähnliche Klinik zeigen Patienten mit Diabetes insipidus renalis. Der entweder vererbte oder erworbene ADH-Typ2-Rezeptordefekt zieht einen verminderten Einbau von Aquaporin oder einen Aquaporindefekt nach sich. Die Symptomatik ähnelt mit Polyurie, Polydipsie, hypotonem Urin und Hypernatriämie der der Bartter Patienten. Eine zuverlässige Abgrenzung zum Bartter Syndrom ist durch das Ausbleiben des sekundären Hyperaldosteronismus bei Diabetes insipidus möglich (Eknoyan, 2010, Kuhlmann et al., 2008).

Eine Erkrankung die ebenfalls mit Polyurie und Polydipsie einhergeht und deshalb hier als Differenzialdiagnose angeführt werden muss, ist der Diabetes insipidus centralis. Bei dieser Erkrankung ist die ADH-Sekretion entweder idiopathisch oder sekundär durch einen Tumor, nach Trauma oder Infektion verringert. Das führt zu einem Anstieg der Plasmanatriumkonzentration und zu einem enormen renalen Wasserverlust. Der zentrale Diabetes insipidus kann vom renalen durch die Diagnose einer verringerten Serum-ADH-Konzentration abgegrenzt werden (Eknoyan, 2010, Kuhlmann et al., 2008).

Eine weitere Differenzialdiagnose ist das Schwartz-Bartter Syndrom. Die Ursache dieses Syndroms liegt in einer gesteigerten ADH-Sekretion, entweder aufgrund eines Tumors (Bronchialkarzinom) oder sekundär infolge einer ZNS-Störung oder -Infektion. Durch den vermehrten Einbau von Aquaporin-Kanälen entsteht bei diesen Patienten eine hypotone Hyperhydratation mit Verdünnungsnatriämie. Die Klinik ist hier stärker durch eine ZNS-Symptomatik geprägt, als durch den Salzverlust. Die Urinosmolarität ist bei dieser Erkrankung erhöht (Kuhlmann et al., 2008).

III. FRAGESTELLUNG

Bei der Gruppe der Bartter Syndrome handelt es sich um autosomal-rezessiv vererbte Salzverlusttubulopathien. Jeder Subtyp wird verursacht durch den Funktionsverlust eines anderen Ionentransporters oder -kanals in der Niere und zeigt damit auch andere charakteristische Symptome. Bartter Typ III liegt eine Mutation des ClC-Kb Kanals zu Grunde und ist gekennzeichnet durch eine hypokaliämische Alkalose, Hypochlorämie und Entwicklungs- und Wachstumsstörungen. Anders als bei anderen Bartter Syndromen treten die Symptome häufig erst im Kindesalter auf. Die Besonderheit von Bartter III liegt in der großen Heterogenität der klinischen Ausprägung und dem Fehlen von Mutations-Hotspots. Die Patienten zeigen teilweise einen hochgradigen Salzverlust, während andere lange Zeit symptomfrei sind und die Diagnose nur als Zufallsbefund gestellt wird.

Da bisher keine ClC-K2 defiziente Mauslinie verfügbar ist und auch keine Möglichkeit besteht den ClC-Kb/2 Kanal pharmakologisch zu inhibieren, wurde für diese Arbeit eine solche Maus generiert. An diesem Modell soll nun die Bedeutung des ClC-Kb/2 für die Niere in funktioneller und regulatorischer Hinsicht untersucht werden. Dabei wird sowohl die Gesamtresorptionsleistung der ClC-K2 $-/-$ Tiere untersucht als auch die Beteiligung des ClC-K2 an den Resorptionsvorgängen des TAL und DCT in verschiedenen Provokationsversuchen näher beleuchtet. Möglichweise können dabei auch andere Chloridkanäle in diesen Tubulussegmenten identifiziert werden. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob der Phänotyp der ClC-K2 $-/-$ Tiere das klinische Bild der Bartter III Patienten widerspiegelt und diese Mauslinie somit ein Tiermodell des klassischen Bartter Syndroms darstellt.

IV. PUBLIKATION: „SALT-LOSING NEPHROPATHY IN MICE WITH A NULL MUTATION OF THE CLCNK2 GENE“ - GRILL ET AL. 2016 ACTA PHYSIOLOGICA

Salt-Losing Nephropathy in Mice with a Null Mutation of the Clcnk2 Gene

Alexandra Grill, Ina Maria Schießl, Bernhard Gess, Katharina Fremter, Anna Hammer,
Hayo Castrop

Institute of Physiology, University of Regensburg, Germany

Correspondence:

Hayo Castrop, Ph.D.

Institute of Physiology

University of Regensburg

Universitätsstr. 31

93040 Regensburg

Germany

Phone +49-941-943-2967

hayo@castrop.com

Abstract

Aim. The basolateral chloride channel ClC-Kb facilitates Cl reabsorption in the distal nephron of the human kidney. Functional mutations in CLCNKB are associated with Bartter's syndrome type 3, a hereditary salt-losing nephropathy. To address the function of ClC-K2 in vivo, we generated ClC-K2-deficient mice.

Methods. ClC-K2-deficient mice were generated using TALEN technology.

Results. ClC-K2-deficient mice were viable and born in a Mendelian ratio. ClC-K2^{-/-} mice showed no gross anatomical abnormalities but they were growth retarded. The 24-hrs urine volume was increased in ClC-K2^{-/-} mice (4.4 ± 0.6 compared with 0.9 ± 0.2 mL/24 hrs in wild type littermates; $p = .001$). Accordingly, ambient urine osmolarity was markedly reduced (590 ± 39 vs. 2216 ± 132 mosmol/L in wild types; $p < 0.0001$). During water restriction (24 hrs), urinary osmolarity increased to 1633 ± 153 and 3769 ± 129 mosmol/L in ClC-K2^{-/-} and wild type mice ($n = 12$; $p < 0.0001$), accompanied by a loss of body weight of $12 \pm 0.4\%$ and $8 \pm 0.2\%$, respectively ($p < 0.0001$). ClC-K2^{-/-} mice showed an increased renal sodium excretion and compromised salt-conservation during a salt-restricted diet. The salt-losing phenotype of ClC-K2^{-/-} mice was associated with a reduced plasma volume, hypotension, a slightly reduced GFR, an increased renal prostaglandin E2 generation, and a massively stimulated renin-angiotensin system. Clckb^{-/-} mice showed a reduced sensitivity to furosemide and were completely resistant to thiazides.

Conclusion. Loss of ClC-K2 compromises TAL function and abolishes salt reabsorption in the DCT. Our data suggest that ClC-K2 is crucial for renal salt reabsorption and concentrating ability. ClC-K2-deficient mice in most aspects mimic patients with Bartter's syndrome type 3.

Introduction

The thick ascending limb of Henle's loop (TAL) reabsorbs approximately 25% of the filtered NaCl load. Consequently, a compromised function of the TAL results in severe salt-losing nephropathies known as Bartter's syndromes. Similarly, pharmacologic blockade of the TAL by loop diuretics, such as furosemide, leads to a pronounced natriuresis and diuresis. Transepithelial salt reabsorption in the TAL is driven by the activity of the basolateral Na/K ATPase and is mediated by the apical Na/K/2Cl cotransporter NKCC2, K recycling by apical ROMK channels, and a basolateral Cl conductance (Greger, 1985). The kidney-specific Cl channels ClC-K2 (in rodents) and ClC-Kb (in humans), which are located in the basolateral membrane of TAL cells, are thought to contribute to the exit of Cl from TAL epithelial cells upon NKCC2-mediated Cl uptake. To be functionally active, ClC-K2 requires the presence of the associated subunit Barttin (Scholl et al., 2006). A variety of mutations in the gene encoding ClC-Kb were found in patients suffering from Bartter's syndrome type 3, also known as classical Bartter's syndrome, suggesting that ClC-Kb is crucial for normal TAL Cl reabsorption (Simon et al., 1997, Bartter et al., 1962).

In addition to its dominant expression in the TAL, recent reports suggested a broader expression pattern of ClC-K2 along the tubular system, including portions of the nephron downstream of the TAL, such as the distal convoluted tubule (DCT) (Vitzthum et al., 2002, Kramer et al., 2008).

In addition to bulk NaCl reabsorption, specialized cells of the TAL have a regulatory function. Thus, macula densa cells, which are located at the most distal portion of the cortical TAL in close contact with the parent glomerulus, modulate preglomerular resistance and renin secretion from granular cells of the afferent arteriole (Skott and Briggs, 1987, Castrop et al., 2010). MD cells function through a set of

transepithelial NaCl transport mechanisms that are similar to those of neighboring TAL cells, including the expression of the basolateral Cl channel ClC-K2 (Vitzthum et al., 2002).

To assess the reabsorptive and regulatory function of ClC-K2 in vivo, we used TALEN technology to generate Clcnk2-deficient mouse lines. We hypothesized that ClC-K2 is required for normal TAL and DCT function and that the phenotype of ClC-K2 -deficient mice may mirror the clinical picture of type 3 Bartter's patients.

By using TALEN, we efficiently introduced a deletion and frame shift into the Clcnk2 gene resulting in a functional knockout. ClC-K2-deficient mice were viable but suffered from a pronounced salt-losing nephropathy. These findings suggest that ClC-K2 represents the functionally dominant basolateral Cl conductance in the TAL. Furthermore, based on experiments using hydrochlorothiazide, our data suggest that ClC-K2 is the only relevant basolateral Cl conductivity in the DCT.

Methods

Generation of ClC-K2-deficient mice. ClC-K2-deficient mice were generated by microinjection with mRNAs of transcription activator-like effector nucleases (TALENs) into fertilized eggs of C57BL/6 mice (Sung et al., 2013). All steps of the generation of the mutant mouse line were performed by Cyagen Biosciences. The ATG start codon of *Clcnk2* is located in exon 2 and this exon was selected as the TALEN target site. The following sequences were used for the construction of the TALENs using the Golden Gate Assembly method: TALEN-left, 5'-TCCTCAGAGAAACCATGGAGGA-3'; spacer, 5'-ATTAGTGGGGCTTCGTGAG-3'; TALEN-right, 5'-TGGCTTCTTGGAGGCGCC-3'. The final construct was confirmed by sequencing. Upon microinjection of the TALEN mRNA, the fertilized eggs were transferred to foster mothers. The targeted locus was amplified from tail biopsies by PCR followed by sequencing using the primers 5'-TGAATGTCCTAGCAGTGGGGC-3' and 5'-GGGCAAGGCTGGTGTGTTCC-3'. Heterozygous G0 founders were crossed with C57BL/6 wild type mice and heterozygous offsprings were crossed to obtain homozygous mice and wild type littermates. All experiments were performed in littermates.

Animals. Female and male 5- to 8-wk-old ClC-K2^{-/-} and ^{+/+} mice were used in all experiments. Animal care and experimentation were approved by local authorities and carried out in accordance with National Institutes of Health principles as outlined in their Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Assessment of urine volume, osmolarity, and concentrating ability. To determine 24h-urine volume, urine was collected in metabolic cages after animals were accustomed to the metabolic cages for three days. Urine osmolarity under ambient conditions was determined in spot urine samples. In additional experiments, the 2-hours urine volume

was measured after single i.p. injections of furosemide (10 mg/kg) and hydrochlorothiazide (15 mg/kg). Urine osmolarity was determined by the freezing-point depression method.

Determination of glomerular filtration rate (GFR). The GFR was measured in conscious mice using FITC-labeled sinistrin clearance after a single retro-orbital injection and consecutive blood sampling from the tail vein (Mederle et al., 2013a).

Immunohistochemistry. Kidneys were perfusion fixed with 3% paraformaldehyde, dehydrated, and embedded in paraffin. Immunolabeling was performed on 5- μ m sagittal paraffin sections. After blocking with 10% horse serum/1% bovine serum albumin in PBS, sections were incubated with rabbit anti-mouse renin-2 (Aviva Systems Biology), mouse anti- α -SMA (Beckman Coulter, Immunotech), rabbit anti-Cox-2 (Cayman) antibodies overnight at 4°C, followed by incubation with Cy5- and Cy2-labeled secondary antibodies (Dianova). Slices were mounted with Dako Cytomation Glycergel mounting medium. The staining was then visualized with an Axiovert Observer Microscope (Carl Zeiss).

Western blotting for cyclooxygenase-1 (Cox-1) and cyclooxygenase-2 (Cox-2). Western blotting was performed according to standard protocols. Before the membranes were incubated with the primary antibody, the blots were stained with ponceau S solution (Santa Cruz) as a loading control. Anti-Cox-1, anti-Cox-2 (Cayman Chemicals) and goat anti rabbit IgG-HRP (Thermo Scientific) were used as primary and secondary antibodies, respectively. Signals were quantified densitometrically after chemiluminescence exposure (Vilber Fusion-FX7).

Measurement of blood volume and plasma volume. Blood and plasma volume were determined using the Evan's Blue dilution method, as described previously (Oppermann et al., 2010).

Blood pressure measurement. Systolic blood pressures and heart rates of conscious mice were determined by tail-cuff manometry (Visitech Systems). Animals were conditioned by placing them into the holding device on 3 consecutive days before the first measurement. Blood pressure was measured daily for 3 days in a row, and the average of these three measurements were used in the analysis.

Determination of plasma renin concentration (PRC). For plasma renin concentrations measurements, blood was collected from conscious mice by puncture of the submandibular vessels with a 22-G needle. Approximately 60 µl of blood were collected into an EDTA-containing microhematocrit tube. Red cells and plasma were separated by centrifugation; the plasma was frozen until used for renin measurements. PRC was measured by ELISA (Angiotensin I EIA Kit, IBL International) as generation of Angiotensin I according to the manufacturer's instructions except that the sample were diluted as follows: plasma samples from *C1C-K2+/+* were diluted 1:10 - 1:100 and samples from *C1C-K2 -/-* mice were diluted 1:500 - 1:200 in maleate buffer following the addition of excess rat substrate. In each assay, substrate without plasma was incubated for the same duration, and any background Ang I formation was subtracted from the plasma-containing samples. In addition, background Ang I levels were determined in a plasma aliquot that was kept frozen without the addition of substrate until assaying (Mederle et al., 2013b).

Determination of urinary PGE2 levels. The urinary PGE 2 concentration was measured using an ELISA kit for PGE2 (prostaglandin E2 EIA Kit (monoclonal), Cayman). The assay was performed according to the manufacturer's instructions except that spot urine samples were diluted 1:100 in ELISA buffer. In a subset of experiments, mice were treated with i.p. injections (once daily) of the specific Cox-2 inhibitor SC-236 (7.5 mg/kg/d) (Penning et al., 1997).

RNA Isolation and Quantitative RT-PCR. Quantitative RT-PCR was performed to determine ClC-K1 and Barttin expression in kidneys of ClC-K2^{-/-} mice and wild type controls. In brief, total RNA was isolated from whole kidneys of ClC-K2-deficient and wild type mice using TRIzol reagent (Invitrogen). Complementary DNA (cDNA) was obtained by reverse transcription (M-MLV-RT; Invitrogen) and real-time PCR was performed for ClC-K1, Barttin and β -actin using a Light-Cycler system (Roche, Mannheim, Germany). ClC-K1 and Barttin mRNA expression levels were normalized to β -actin mRNA expression. The following oligonucleotide primers were used: 5'-gggctccaggccaagagcga -3' (sense ClC-K1), 5'-ctggtgggttgatcaaggtg -3' (antisense ClC-K1), 5'-gaatcggcttcacgtgctg -3' (sense Barttin), and 5'-cggctcaccagcaggetcag -3' (antisense Barttin).

Analysis of blood electrolytes and urine parameters. Analysis of blood and urine parameters was performed by IDEXX BioResearch Laboratories Ludwigsburg, Germany.

Statistics. Data are expressed as the mean and SEM. Statistical comparisons were performed using Student's t-test or ANOVA with Bonferroni post hoc testing when necessary. A p-value <0.05 was considered significant.

Results

Targeting of *Clcnk2* by transcription activator-like effector nucleases (TALEN). TALEN mRNA was expressed in fertilized eggs to target the mouse *Clcnk2* gene, which produced 4 mouse lines with heterozygous mutations of the target gene. One mouse line was used for further breeding. In this line, the TALEN-mediated DNA double strand break was repaired by non-homologous end joining resulting in an 11 base pair deletion in exon 2 (5'-gtggggcttcg-3'). This deletion resulted in a frame shift and a premature stop codon. The mutated transcript was predicted to be potentially translated in a truncated peptide consisting of the first 4 amino acids of the protein (out of the 687 amino acids of the total protein). However, in homozygous *Clcnk2*^{-/-} mice, the downstream exons 3 and 4 could not be amplified by RT-PCR suggesting nonsense-mediated decay of the mRNA (fig. 1).

CIC-K2^{-/-} mice were viable and were obtained in a near Mendelian ratio of 31%, 44%, and 25% for *CIC-K2*^{+/+}, *+/−*, and *−/−*, respectively (n=221 in total). *CIC-K2*^{-/-} mice showed no gross anatomical abnormalities but they were growth retarded, as shown in the growth charts in figure 2. Furthermore, we found no obvious indications of hearing deficits, as judged from the reaction to finger snipping.

The analysis of a number of plasma constituents revealed that *CIC-K2*^{-/-} mice had lower plasma K concentrations compared with wild types (table 1A), with plasma K in both genotypes being in the normal range for C57BL/6 mice (Arrighi et al., 2001). Similarly, plasma Cl was reduced in *CIC-K2*^{-/-} compared with wild type mice (table 1A). We found no evidence for a general alkalosis in *CIC-K2*^{-/-} mice, but plasma bicarbonate concentrations tended to be higher in *CIC-K2*^{-/-} compared with wild type mice, with considerable scattering of data (table 1A). There were no significant differences in the plasma concentrations of calcium, magnesium, and phosphate

between genotypes (table 1A). As summarized in table 1B, we found increased urinary excretion rates of Na, K and Cl in *ClC-K2*^{-/-} compared with wild type mice.

Urine volume, urinary osmolarity, concentrating ability, and renal salt conservation. To examine the contribution of *ClC-K2* to renal salt reabsorption and concentrating ability, we first determined the 24-hr urine volume and urinary osmolarity. The 24-hr urine volume of 6-week-old mice was 4.4 ± 0.6 mL in *ClC-K2*^{-/-}, which was approximately 5 times the urine volume of wild type littermates (0.9 ± 0.2 mL; $n=6$; $p=0.001$; fig. 3A). Accordingly, ambient urine osmolarity was markedly reduced in *ClC-K2*-deficient mice (590 ± 39 vs. 2216 ± 132 mosmol/L in wild type animals; $n=12$; $p<0.0001$; fig. 3B). To further assess the renal concentrating ability, the urinary osmolarity was measured after 24 hours of water restriction. Both genotypes appeared to tolerate the water restriction without conspicuous or lethargic behavior, but the loss of body weight was larger in *ClC-K2*^{-/-} compared with wild type mice ($p<0.0001$; fig. 3C). During water restriction, urinary osmolarity increased to 1633 ± 153 and 3769 ± 129 in *ClC-K2*^{-/-} and wild type mice, respectively ($n=12$; $p<0.0001$; fig. 3D).

To assess renal salt reabsorptive capacity, *ClC-K2*^{-/-} and wild type mice were fed a salt-restricted diet (0.02% NaCl, w/w) and urinary sodium loss was monitored over 24 hours. At baseline (standard rodent chow, 0.4% NaCl, w/w) urinary Na excretion was increased in *ClC-K2*^{-/-} compared with wild type mice, averaging 0.29 ± 0.06 and 0.14 ± 0.03 mmol/hr/g, respectively ($p=.03$; $n=9$ for each genotype). When the standard chow was changed to a salt-restricted diet, urinary Na excretion gradually declined in wild type mice reaching 0.009 ± 0.0005 mmol/hr/g after 24 hours. *ClC-K2*-deficient mice also reduced their Na excretion in response to the low salt diet but reached a plateau after 12 hours. Thus, Na excretion in *ClC-K2*^{-/-} during a low salt diet averaged 0.11 ± 0.02 and 0.13 ± 0.04 after 12 and 24 hours, respectively, and remained

significantly higher compared with wild type mice ($p=.0002$; fig. 4).

In vivo assessment of TAL and DCT function. To further assess the TAL function in vivo, the diuretic action of a single injection of furosemide (10 mg/kg) was determined in *C1C-K2*^{-/-} and ^{+/+} mice. In these experiments, the 2-hrs urine volume at baseline averaged 18.3 ± 2 and 8.3 ± 1 $\mu\text{L/g}$ in *C1C-K2*^{-/-} and ^{+/+} mice, respectively ($p<.001$). Within 2 hours of the furosemide injection, *C1C-K2*^{-/-} mice excreted 26.5 ± 8 $\mu\text{L/g}$ of urine, which was considerably less than what was found in wild type mice (36.2 ± 20 $\mu\text{L/g}$) ($n=8$; $p=.009$; fig. 5A). Accordingly, urine osmolarity dropped from 1115 ± 250 to 428 ± 10 mosmol/L in wild type mice, whereas it only slightly decreased in *C1C-K2*-deficient mice (from 470 ± 50 to 383 ± 6 mosmol/L; fig. 5B). Analogous experiments were performed for the DCT. After a single i.p. injection of hydrochlorothiazide (HZT, 15 mg/kg), the 2-hrs urine volume increased to 23.1 ± 8 $\mu\text{L/g}$ in wild type mice, and urine osmolarity decreased to 817 ± 210 $\mu\text{L/g}$ (fig. 5C,D). In contrast to wild type mice, *C1C-K2*^{-/-} mice were HZT-resistant and showed no changes in urine volume and osmolarity over the 2 hours period (fig. 5C,D).

Glomerular filtration rate (GFR). The absolute GFR of *C1C-K2*^{-/-} mice was reduced compared with wild type controls (fig. 6A). When the GFR was normalized to body weight, the difference between the genotypes was smaller, with a GFR of 1040 ± 97 in *C1C-K2*^{-/-} and 1395 ± 129 $\mu\text{L/min/100 g}$ body weight in wild type controls ($n=9$; $p=.04$; fig. 6B).

Plasma and blood volume. To assess if the concentrating defect of *Clckb*-deficient mice led to volume depletion under steady-state conditions, the plasma volume was determined using the Evan's Blue dilution method. The plasma volume of *Clckb*^{-/-} mice was markedly reduced when compared with that of the wild type controls (table 1A). With a hematocrit of 48.6 ± 1.2 and 44.0 ± 0.5 % in *C1C-K2*^{-/-} and ^{+/+} mice,

respectively ($p=0.004$), the calculated blood volume was $5.5\pm 1.4\%$ of body weight in ClC-K2^{-/-} and $8.2\pm 0.4\%$ of body weight in ClC-K2^{+/+} mice ($p=0.03$; table 1A).

Arterial blood pressure. Considering the reduced plasma volume of ClC-K2^{-/-} mice, we next determined arterial blood pressure by tail cuff manometry. ClC-K2-deficient mice were considerable hypotonic. Thus, systolic arterial blood pressure averaged 74.6 ± 1.1 and 116.6 ± 1.4 mm Hg in ClC-K2^{-/-} and ClC-K2^{+/+} mice, respectively ($n=20$; $p<0.0001$; fig. 7).

Plasma renin concentration (PRC) and renin protein expression. To assess compensatory mechanisms of hypotension in the ClC-K2-deficient mice, we next determined PRC. Baseline PRC, as determined in the presence of excess exogenous rat substrate, was massively increased in ClC-K2^{-/-} compared with wild type mice, averaging 35720 ± 8941 and 56 ± 8 ng Ang I/ml/min, respectively ($n=11$ each; $p<0.0001$; fig. 8A). After acute administration of the loop diuretic furosemide, which is thought to activate the macula densa control of renin secretion, PRC increased to 126800 ± 31000 ng Ang I/ml/min in ClC-K2^{-/-} ($n=8$; $p=0.002$ vs. baseline) and to 1225 ± 66 ng Ang I/ml/min in ClC-K2^{+/+} mice ($n=8$; $p<0.0001$ vs. baseline; $p=0.0005$ between genotypes; fig 8B). Thus, PRC after furosemide increased 3.5-fold in ClC-K2^{-/-} and 22-fold in wild type mice ($p=0.001$; fig. 8C). The high baseline PRC of ClC-K2^{-/-} mice was accompanied by a considerable recruitment of renin expressing cells along the entire afferent arterioles and upstream portions of the arterial vascular tree (fig. 9). Upon closer inspection, afferent and efferent arterioles appeared dilated and some vascular walls were thickened in the kidneys of ClC-K2^{-/-} mice (fig. 9C). In addition to its classical expression in the juxtaglomerular position, we detected renin in the tubular system of ClC-K2^{-/-} mice, albeit at lower intensities (fig. 9I). In contrast to the ClC-K2^{-/-} mice, tubular renin expression was barely detectable in wild type animals (fig. 9J).

Urinary prostaglandin excretion and Cox-2 expression. Bartter's syndromes in humans are generally associated with hyperprostaglandinemia and enhanced excretion of prostaglandins in urine. Similar to the observations in human patients, the urinary prostaglandin E₂/osmolarity ratio was markedly increased in Clc-K2-deficient mice, averaging 9.1 ± 1.1 compared with 1.3 ± 0.1 ng/mosmol in wild type mice (n=13; p<.0001; fig. 10A). Urine osmolarity was used as a reference, because the commonly used creatinine concentration appeared inadequate due to its known proximal tubular secretion and due to the differences in GFR between Clc-K2^{-/-} and +/+ mice (Eisner et al., 2010). To determine the source of the increased PGE₂ excretion of Clc-K2^{-/-} mice, we analyzed the renal expression of the inducible Cox-2 using immunohistochemistry. There were a few Cox-2 positive cells in wild type cortical TALs, predominantly in the MD region (fig. 10B). In contrast to wild type controls, we found intense Cox-2 staining in the MD and a recruitment of Cox-2-positive TAL cells in Clc-K2^{-/-} kidneys, as shown in fig. 10C. In addition to the cortical expression, there was considerable upregulation of Cox-2 expression in the renal medulla of Clc-K2^{-/-} kidneys in comparison with wild type controls. To quantify the renal Cox-2 expression, we performed Western blotting for Cox-2 in protein from Clc-K2^{-/-} and +/+ kidneys. The normalized renal Cox-2 protein expression averaged 0.092 ± 0.02 rU in Clc-K2^{-/-} and 0.022 ± 0.003 rU in wild type kidneys (n=6; p=.02; fig. 10D), which confirmed the apparent upregulation of Cox-2 in Clc-K2^{-/-} kidneys observed by immunohistochemistry. In contrast to Cox-2, Cox-1 protein expression was similar in both genotypes (fig. 10E).

Treatment of Clc-K2^{-/-} mice with the Cox-2 inhibitor SC-236. In view of the high levels of PGE₂ excretion in Clc-K2^{-/-} mice and considering the induction of renal Cox-2 expression, mice were treated with the specific Cox-2 inhibitor SC-236 (7.5 mg/kg/d) in an attempt to normalize kidney function (Penning et al., 1997). SC-236 treatment reduced the urinary PGE₂ excretion in both genotypes (fig. 11A). During SC-

236 treatment, the daily water consumption of ClC-K2^{-/-} mice gradually declined and was similar to the water intake in wild type mice after 7 days of the treatment (fig. 11B). In parallel, ambient urinary osmolarity increased in both genotypes (fig. 11C). During SC-236 treatment, ClC-K2-deficient mice gained body weight and reduced their relative growth retardation compared with wild type littermates (fig. 11D).

Expression levels of ClC-K1 and Barttin. In view of the overall mild phenotype of ClC-K2-deficient mice, we addressed the expression levels of the highly homologous ClC-K1 and the regulatory subunit Barttin in total kidneys. Due to the lack of specific antibodies for ClC-K1, the mRNA expression levels were determined with quantitative real time RT-PCR. As shown in figure 12, the renal mRNA expression of Barttin was similar in both genotypes, whereas the ClC-K1 mRNA abundance was slightly reduced in ClC-K2^{-/-} mice.

Discussion

The basolateral Cl extrusion from TAL cells is crucial for TAL reabsorptive function. Because of to the lack of specific pharmacological tools to block ClC-K2, the contribution of ClC-K2 to TAL Cl conductance and the identity of other potential Cl channels have been difficult to determine. Therefore, in the present study, we generated ClC-K2-deficient mouse lines using TALEN technology. Transcription activator-like effector nucleases, which are similar to the Zn-finger nucleases, can be used to induce DNA double strand breaks in a specific target locus (Sung et al., 2013). As an advantage over classical gene targeting by homologous recombination approaches, TALEN technology does not require the use of embryonic stem cells, because the nucleases are highly efficient and can be applied directly to fertilized eggs (Sung et al., 2013). However, a drawback of TALEN technology is that the location and extent of DNA deletion induced by the cellular repair of the DNA double strand break (non-homologous end joining) is not entirely predictable, which is in contrast to gene targeting by the highly precise homologous recombination technology. Nevertheless, when a null mutation is desired, the TALEN technology is an efficient, fast, and cost-effective method for gene targeting. For the target *Clcnk2*, we obtained 4 founder animals, each of which had a different deletion (between 1 and 11 base pairs), but all of them were predicted to lead to a functional knockout of the target gene due to frame-shifts. Furthermore, the translation of potential truncated proteins appeared unlikely because we did not detect any mRNA derived from the downstream exons 3 and 4, suggesting nonsense-mediated decay of the mRNA (Baker and Parker, 2004).

As the key finding of the study, ClC-K2-deficient mice showed marked diuresis and a compromised urinary concentrating ability, accompanied by a reduced salt-retaining capacity. The salt- and water-losing phenotype was apparently severe because

CIC-K2^{-/-} were volume contracted even when the animals had free access to water. Nevertheless, the salt-losing nephropathy of CIC-K2^{-/-} mice was more discrete than that of NKCC2-deficient mice. Thus, in NKCC2-deficient mice, the urinary osmolarity was 370 mosmol/L, which is close to plasma osmolarity (Takahashi et al., 2000). During water restriction, urinary osmolarity increased only marginally in NKCC2-deficient mice (to 420 mosmol/L after 24 hrs of water restriction), whereas it rose to 1633 mosmol/L in CIC-K2^{-/-} mice, suggesting a residual concentrating ability. Furthermore, NKCC2-deficient mice apparently suffered from renal insufficiency, as judged from a 3-fold increase in plasma creatinine (Takahashi et al., 2000), whereas GFR was only slightly reduced in CIC-K2^{-/-} compared with wild type littermates. Without treatment, none of the NKCC2^{-/-} pups survived to weaning, whereas survival of CIC-K2^{-/-} mice was inconspicuous. Consequently, these data suggest that alternate Cl exit pathways exist in TAL cells, which render the transepithelial salt transport partially functional. The highly homologue CIC-K1, and the K/Cl cotransporter are candidates to mediate a minor proportion of TAL basolateral Cl exit (Di Stefano et al., 2001). CIC-K1 initially was thought to be restricted to the thin limb of Henle of the renal inner medulla but other reports suggested a broader expression pattern, including the TAL (Kramer et al., 2008, Uchida et al., 1993, Uchida et al., 1995, Kieferle et al., 1994). However, because of the high homology at the protein level, all localization studies that aimed to localize CIC-K2 and CIC-K1 in parallel were restricted to in situ hybridization and RT-PCR of microdissected nephron fragments. In contrast to CIC-K2^{-/-} mice, and congruent with a dominant localization of CIC-K1 in the thin limb of Henle's loop, CIC-K1-deficient mice were unable to concentrate the urine in response to water restriction and were virtually vasopressin-resistant, but they had a normal hematocrit and showed no signs of dehydration in states of euhydration (Matsumura et al., 1999). In contrast to CIC-K1^{-/-} mice, CIC-K2 deficiency resulted in a volume contraction, even when the animals had

free access to water.

To assess the functional impact of the loss of ClC-K2 in an acute setting, mice received a single injection of the loop diuretic furosemide. The diuretic effect of furosemide was reduced in ClC-K2^{-/-} mice compared with wild type controls, suggesting a compromised TAL transepithelial salt transport at baseline. The residual diuretic effect of furosemide again suggests the existence of alternative Cl extrusion pathways of TAL cells, such as ClC-K1. These alternative Cl pathways likely are independent of the expression levels of ClC-K1 and Barttin because the expression level of ClC-K1 was slightly reduced in ClC-K2-deficient mice with unchanged Barttin expression. However, it should be noted that the mRNA expression levels of ion channels and transporters often poorly reflect their in situ activity.

Based on our in vivo experiments using hydrochlorothiazide, there is a striking difference between the TAL and the DCT in terms of basolateral Cl conductivity. Although blockade of NCC by HCT caused a marked diuresis and a reduction in urine osmolarity in wild type mice, ClC-K2-deficient mice were completely resistant to HCT. These data suggest that the expression of ClC-K2 is an absolute requirement for salt reabsorption in the DCT. Furthermore, in the absence of ClC-K2, there appear to be no functionally relevant alternate pathways for transepithelial Cl movement in the DCT (Nissant et al., 2004, McCormick and Ellison, 2015).

Although still in the normal range for C57BL/6 mice, ClC-K2^{-/-} mice had lower plasma K concentrations and showed an increased fractional renal K excretion compared with wild type mice. Similarly, Bartter's patients are usually hypokalemic (Kramer et al., 2008). According to the traditional view, hypokalemia in Bartter's patients, and similarly during loop diuretic application, is caused by forced K secretion in the collecting duct, which is mediated by a compensatory Na reabsorption by eNaC

(Hropot et al., 1985).

CIC-K2^{-/-} mice did not suffer from alkalosis, but plasma bicarbonate concentrations tended to be higher in CIC-K2^{-/-} compared with wild type mice. The substantial scattering of the bicarbonate values in CIC-K2^{-/-} mice is similar to the situation in type 3 Bartter's patients. Thus, many patients show alkalosis, whereas some patients with specific mutations show no signs of apparent acid-base disturbances (Andrini et al., 2014, Zelikovic et al., 2003). At least in human patients, this inconsistent acid-base disturbance may be related to the highly variable dietary acid load and to some residual function of some of the CIC-Kb mutations. In contrast to human patients, mice in general appear to be more resistant to acid-base disturbances caused by compromised tubular function. Thus, no significant alkalosis was reported in NCC-deficient mice, whereas alkalosis is a common symptom of human Gitelman's syndrome (Schultheis et al., 1998).

Plasma renin concentration was increased more than 500-fold in CIC-K2^{-/-} mice compared with wild type animals, which was accompanied by a massive recruitment of renin-positive cells along the entire afferent arteriole and further upstream in the vascular tree. The thickening of the wall of renin-positive vessels resembles the histology of other models with chronically activated renin synthesis, such as ACE-, AT1-, and angiotensinogen-deficient mouse lines (Inokuchi et al., 2001, Kihara et al., 1998, Hilgers et al., 1997). The most likely explanation for this stimulation of the renin system is twofold. First, volume loss due to compromised TAL function leads to the activation of several compensatory systemic mechanisms, such as stimulation of the sympathetic nervous system, which increase renin secretion and the recruitment of renin-producing cells (Castrop et al., 2010). Second, the loss of CIC-K2 likely compromises the sensor function of the macula densa cells by mimicking extremely low

tubular chloride concentrations, which results in a stimulatory signal sent to the renin-producing cells (Castrop et al., 2010). In line with this assumption, the relative increment of PRC that was triggered by the administration of furosemide was smaller in *Clc-K2^{-/-}* compared with wild type mice. The stimulatory macula densa signal presumably consists of an enhanced generation of prostaglandin E2 and prostacyclin (Harris et al., 1994, Peti-Peterdi et al., 2003). In line with this assumption, the Cox-2 expression in the macula densa cells of *Clc-K2^{-/-}* mice was markedly upregulated compared with wild type animals. In view of the massively stimulated renin system in the *Clc-K2^{-/-}* mice, and, by inference, the high angiotensin II levels, we also evaluated renin expression in the tubular system. We found considerable immunolabeling of renin in the tubular system of *Clc-K2^{-/-}* mice whereas virtually no tubular renin was present in wild type kidneys. These results are congruent with recent reports demonstrating an AT1 receptor-dependent stimulation of tubular renin expression in the presence of high circulating angiotensin II levels (Gonzalez et al., 2011, Prieto-Carrasquero et al., 2005).

As mentioned above, prostaglandin E2 excretion and renal cyclooxygenase-2 expression were markedly enhanced in *Clc-K2^{-/-}* compared with wild type mice. This finding is in agreement with previous reports indicating exaggerated prostanoid formation in Bartter's patients and, similarly, during the application of loop diuretics (Bartter, 1977). Furthermore, the phenotype of *Clc-K2*-deficient mice was considerably ameliorated by the treatment with SC-236, a specific Cox-2 inhibitor. Similarly, patients suffering from Bartter's syndrome frequently benefit from the treatment with NSAIDs, independent of the specific mutation that causes the syndrome. Although the mechanisms of the beneficial action of NSAIDs in Bartter's patients is not fully understood, it appears likely that a reduction of the natriuretic and diuretic actions of PGE2 is involved (Breyer and Breyer, 2000).

In summary, the phenotype of ClC-K2-deficient mice in many aspects resembles the clinical picture of type 3 Bartter's patients. In comparison to the virtually lethal phenotype of NKCC2- and ROMK-deficient mouse strains (Lorenz et al., 2002, Takahashi et al., 2000), the phenotype of ClC-K2^{-/-} mice was less severe, similar to the situation in type 3 Bartter's patients. Our data suggest that ClC-K2 markedly contributes to TAL transepithelial salt transport, and to the renal concentrating ability. A residual TAL function in ClC-K2-deficient mice suggests the existence of alternative Cl transepithelial pathways, most likely including the basolateral ClC-K1. In contrast to the TAL, ClC-K2 appears to exclusively facilitate basolateral Cl exit and, consequently, salt reabsorption in the DCT fully depends on an intact ClC-K2 function.

Acknowledgement

This study was in part supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB699/A4).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Andrini, O., Keck, M., L'Hoste, S., Briones, R., Mansour-Hendili, L., Grand, T., Sepulveda, F. V., Blanchard, A., Lourdel, S., Vargas-Poussou, R. & Teulon, J. 2014. CLCNKB mutations causing mild Bartter syndrome profoundly alter the pH and Ca²⁺ dependence of ClC-Kb channels. *Pflugers Arch*, 466, 1713-23.
- Arrighi, I., Bloch-Faure, M., Grahammer, F., Bleich, M., Warth, R., Mengual, R., Drici, M. D., Barhanin, J. & Meneton, P. 2001. Altered potassium balance and aldosterone secretion in a mouse model of human congenital long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 8792-7.
- Baker, K. E. & Parker, R. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 293-9.
- Bartter, F. C. 1977. Bartter's syndrome. *Urol Clin North Am*, 4, 253-61.
- Bartter, F. C., Pronove, P., Gill, J. R., Jr. & Maccardle, R. C. 1962. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. *Am J Med*, 33, 811-28.
- Breyer, M. D. & Breyer, R. M. 2000. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279, F12-23.
- Castrop, H., Hocherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V. & Wagner, C. 2010. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev*, 90, 607-73.
- Di Stefano, A., Jounier, S. & Wittner, M. 2001. Evidence supporting a role for KCl cotransporter in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int*, 60, 1809-23.
- Eisner, C., Faulhaber-Walter, R., Wang, Y., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S., Mizel,

- D., Star, R. A., Briggs, J. P., Levine, M. & Schnermann, J. 2010. Major contribution of tubular secretion to creatinine clearance in mice. *Kidney Int*, 77, 519-26.
- Gonzalez, A. A., Liu, L., Lara, L. S., Seth, D. M., Navar, L. G. & Prieto, M. C. 2011. Angiotensin II stimulates renin in inner medullary collecting duct cells via protein kinase C and independent of epithelial sodium channel and mineralocorticoid receptor activity. *Hypertension*, 57, 594-9.
- Greger, R. 1985. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev*, 65, 760-97.
- Harris, R. C., McKanna, J. A., Akai, Y., Jacobson, H. R., Dubois, R. N. & Breyer, M. D. 1994. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest*, 94, 2504-10.
- Hilgers, K. F., Reddi, V., Krege, J. H., Smithies, O. & Gomez, R. A. 1997. Aberrant renal vascular morphology and renin expression in mutant mice lacking angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*, 29, 216-21.
- Hropot, M., Fowler, N., Karlmark, B. & Giebisch, G. 1985. Tubular action of diuretics: distal effects on electrolyte transport and acidification. *Kidney Int*, 28, 477-89.
- Inokuchi, S., Kimura, K., Sugaya, T., Inokuchi, K., Murakami, K. & Sakai, T. 2001. Hyperplastic vascular smooth muscle cells of the intrarenal arteries in angiotensin II type 1a receptor null mutant mice. *Kidney Int*, 60, 722-31.
- Kieferle, S., Fong, P., Bens, M., Vandewalle, A. & Jentsch, T. J. 1994. Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 6943-7.
- Kihara, M., Umemura, S., Sumida, Y., Yokoyama, N., Yabana, M., Nyui, N., Tamura,

- K., Murakami, K., Fukamizu, A. & Ishii, M. 1998. Genetic deficiency of angiotensinogen produces an impaired urine concentrating ability in mice. *Kidney Int*, 53, 548-55.
- Kramer, B. K., Bergler, T., Stoelcker, B. & Waldegger, S. 2008. Mechanisms of Disease: the kidney-specific chloride channels *ClCKA* and *ClCKB*, the Barttin subunit, and their clinical relevance. *Nat Clin Pract Nephrol*, 4, 38-46.
- Lorenz, J. N., Baird, N. R., Judd, L. M., Noonan, W. T., Andringa, A., Doetschman, T., Manning, P. A., Liu, L. H., Miller, M. L. & Shull, G. E. 2002. Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome. *J Biol Chem*, 277, 37871-80.
- Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S. B., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S. & Marumo, F. 1999. Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the *CLC-K1* chloride channel. *Nat Genet*, 21, 95-8.
- McCormick, J. A. & Ellison, D. H. 2015. Distal convoluted tubule. *Compr Physiol*, 5, 45-98.
- Mederle, K., Mutig, K., Paliege, A., Carota, I., Bachmann, S., Castrop, H. & Oppermann, M. 2013a. Loss of *WNK3* is compensated for by the *WNK1/SPAK* axis in the kidney of the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*, 304, F1198-209.
- Mederle, K., Schweda, F., Kattler, V., Doblinger, E., Miyata, K., Hocherl, K., Oike, Y. & Castrop, H. 2013b. The angiotensin II AT1 receptor-associated protein *Arap1* is involved in sepsis-induced hypotension. *Crit Care*, 17, R130.
- Nissant, A., Lourdel, S., Baillet, S., Paulais, M., Marvao, P., Teulon, J. & Imbert-Teboul, M. 2004. Heterogeneous distribution of chloride channels along the

distal convoluted tubule probed by single-cell RT-PCR and patch clamp. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287, F1233-43.

Oppermann, M., Gess, B., Schweda, F. & Castrop, H. 2010. Atrap deficiency increases arterial blood pressure and plasma volume. *J Am Soc Nephrol*, 21, 468-77.

Penning, T. D., Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Carter, J. S., Collins, P. W., Docter, S., Graneto, M. J., Lee, L. F., Malecha, J. W., Miyashiro, J. M., Rogers, R. S., Rogier, D. J., Yu, S. S., AndersonGd, Burton, E. G., Cogburn, J. N., et al. 1997. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benze nesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem*, 40, 1347-65.

Peti-Peterdi, J., Komlosi, P., Fuson, A. L., Guan, Y., Schneider, A., Qi, Z., Redha, R., Rosivall, L., Breyer, M. D. & Bell, P. D. 2003. Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE2 release from macula densa cells. *J Clin Invest*, 112, 76-82.

Prieto-Carrasquero, M. C., Kobori, H., Ozawa, Y., Gutierrez, A., Seth, D. & Navar, L. G. 2005. AT1 receptor-mediated enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289, F632-7.

Scholl, U., Hebeisen, S., Janssen, A. G., Muller-Newen, G., Alekov, A. & Fahlke, C. 2006. Barttin modulates trafficking and function of ClC-K channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 11411-6.

Schultheis, P. J., Lorenz, J. N., Meneton, P., Nieman, M. L., Riddle, T. M., Flagella, M., Duffy, J. J., Doetschman, T., Miller, M. L. & Shull, G. E. 1998. Phenotype resembling Gitelman's syndrome in mice lacking the apical Na⁺-Cl⁻

cotransporter of the distal convoluted tubule. *J Biol Chem*, 273, 29150-5.

Simon, D. B., Bindra, R. S., Mansfield, T. A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J. M., Sanjad, S. A., Taylor, C. M., Pilz, D., Brem, A., et al. 1997. Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet*, 17, 171-8.

Skott, O. & Briggs, J. P. 1987. Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science*, 237, 1618-20.

Sung, Y. H., Baek, I. J., Kim, D. H., Jeon, J., Lee, J., Lee, K., Jeong, D., Kim, J. S. & Lee, H. W. 2013. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol*, 31, 23-4.

Takahashi, N., Chernavvsky, D. R., Gomez, R. A., Igarashi, P., Gitelman, H. J. & Smithies, O. 2000. Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5434-9.

Uchida, S., Sasaki, S., Furukawa, T., Hiraoka, M., Imai, T., Hirata, Y. & Marumo, F. 1993. Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J Biol Chem*, 268, 3821-4.

Uchida, S., Sasaki, S., Nitta, K., Uchida, K., Horita, S., Nihei, H. & Marumo, F. 1995. Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, *ClC-K1*. *J Clin Invest*, 95, 104-13.

Vitzthum, H., Castrop, H., Meier-Meitingner, M., Riegger, G. A., Kurtz, A., Kramer, B. K. & Wolf, K. 2002. Nephron specific regulation of chloride channel *CLC-K2* mRNA in the rat. *Kidney Int*, 61, 547-54.

Zelikovic, I., Szargel, R., Hawash, A., Labay, V., Hatib, I., Cohen, N. & Nakhoul, F.

2003. A novel mutation in the chloride channel gene, CLCNKB, as a cause of Gitelman and Bartter syndromes. *Kidney Int*, 63, 24-32.

Figures and legends

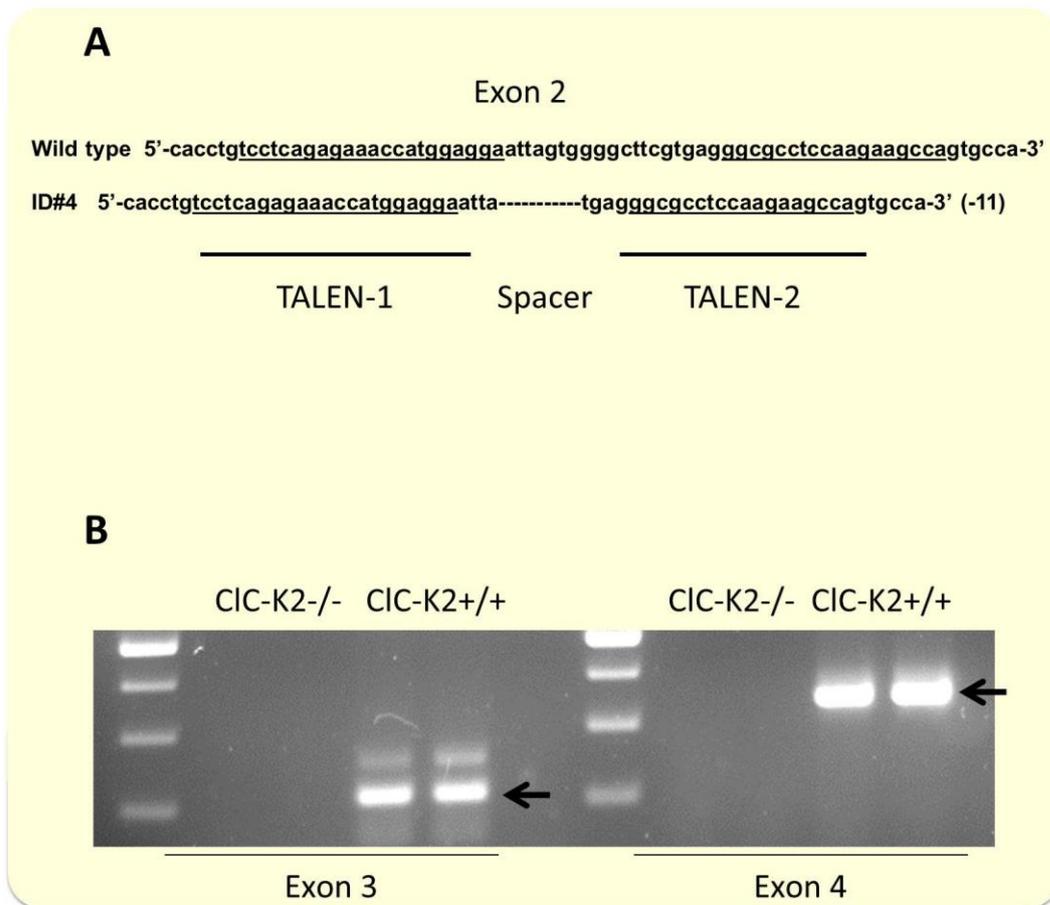


Figure 1. Targeting Strategy. (A) Genomic mutation induced by non-homologous end joining upon TALEN-induced DNA double strand break. The mutation (ID #4) caused a frame shift and a premature stop codon leading to the potential translation of a 4-amino acids peptide. (B) RT-PCR on RNA from kidneys from homozygous CIC-K2^{-/-} and wild type mice. Amplification of cDNA products spanning from exon 2 to exon 3 and 4, respectively, gave no products in kidneys from CIC-K2^{-/-} mice suggesting nonsense-mediated decay of the mutated transcript.

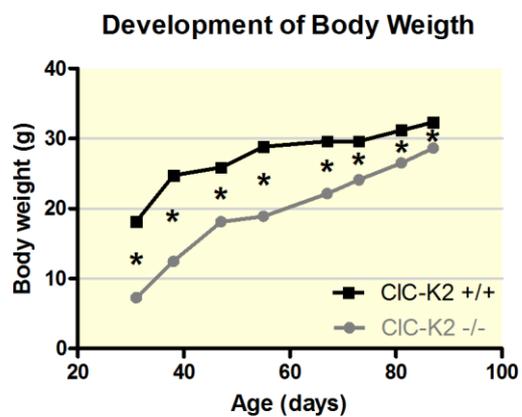


Figure 2. Body weight development of Clc-K2^{-/-} and +/+ mice between the age of 31 and 85 days (n=10; 5 males and 5 females). * indicates p<.05.

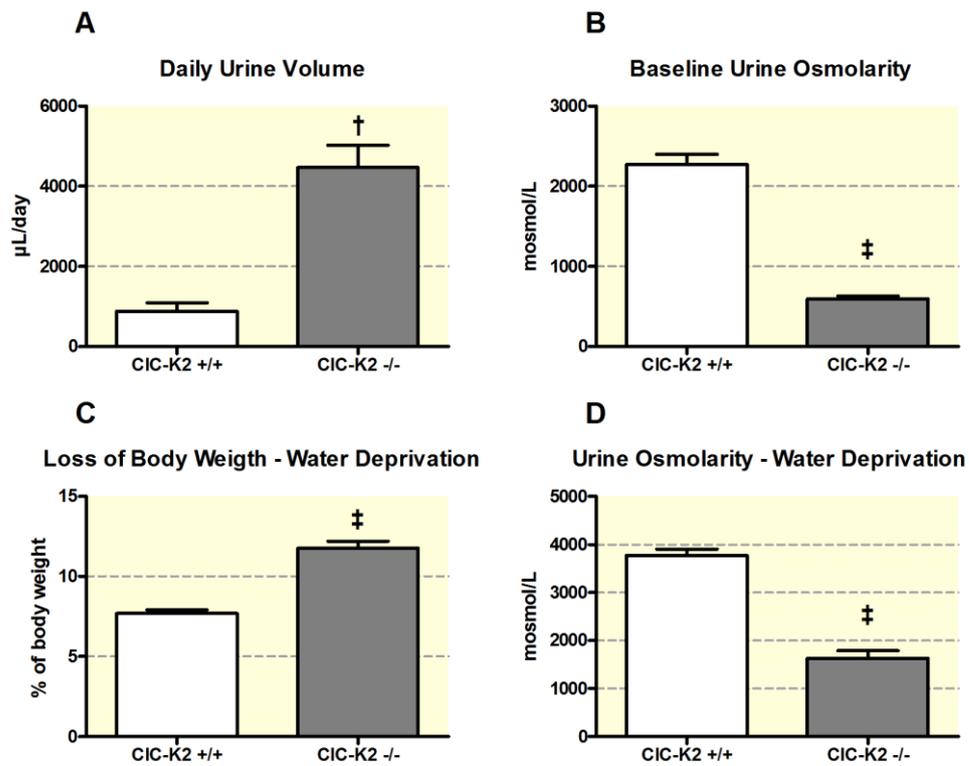


Figure 3. Urine analysis. (A) 24-hrs urine volume (n=6) and (B) osmolarity of spot urine samples of Clc-K2^{-/-} and wild type mice (n=12). (C) Relative loss of body weight (%) after 24 hours of water restriction, and (D) urinary osmolarity after 24 hours of water restriction (n=12). † indicates p<.01, ‡ indicates p<.001

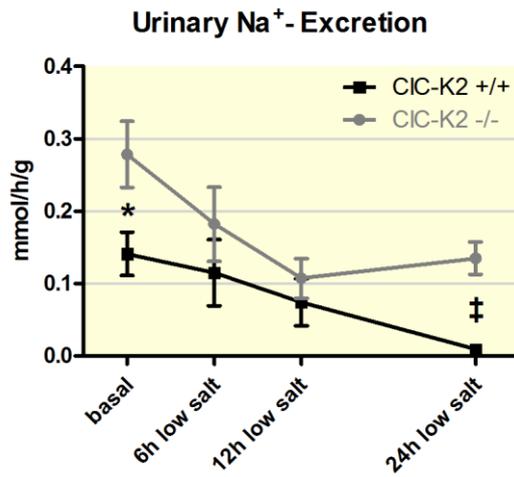


Figure 4. Urinary Na excretion during normal conditions (standard rodent chow, 0.4% NaCl [w/w]) and during a salt-restricted diet (0.02% NaCl [w/w]). Data are given as mmol/g body weight/h (n=9). * indicates p<.05, ‡ indicates p<.001

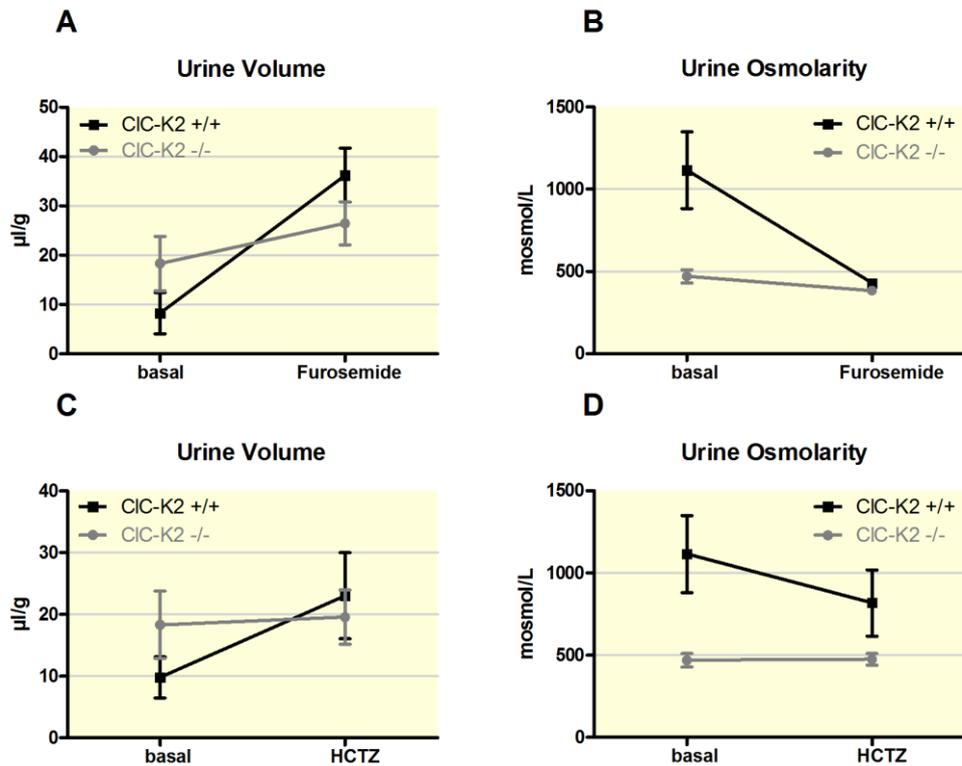


Figure 5. In vivo functional assessment of tubular function. Increase of 2-hrs urine volume (A) and urine osmolarity (B) after a single injection of furosemide (10 mg/kg; i.p.) (n=8). Increase of 2-hrs urine volume (C) and urine osmolarity (D) after a single injection of hydrochlorothiazide (HCTZ, 15 mg/kg; i.p.) (n=8).

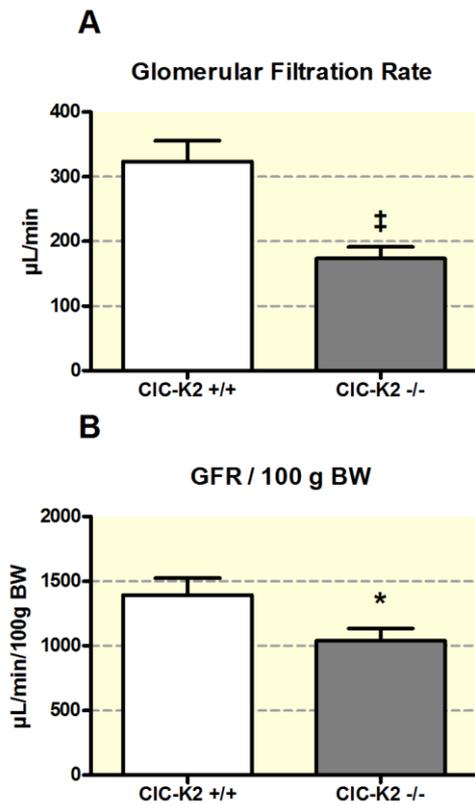


Figure 6. Glomerular filtration rate (GFR). (A) Absolute GFR as determined by FITC-sinistrin clearance in conscious CIC-K2^{-/-} and +/+ mice (n=9). (B) GFR normalized to body weight (n=9). * indicates p<.05, ‡ indicates p<.001

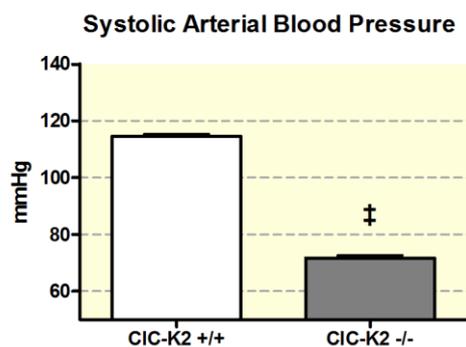


Figure 7. Arterial blood pressure. Systolic arterial blood pressure was determined using tail cuff manometry in conscious ClC-K2^{-/-} and wild type mice (n=20). ‡ indicates p<.001

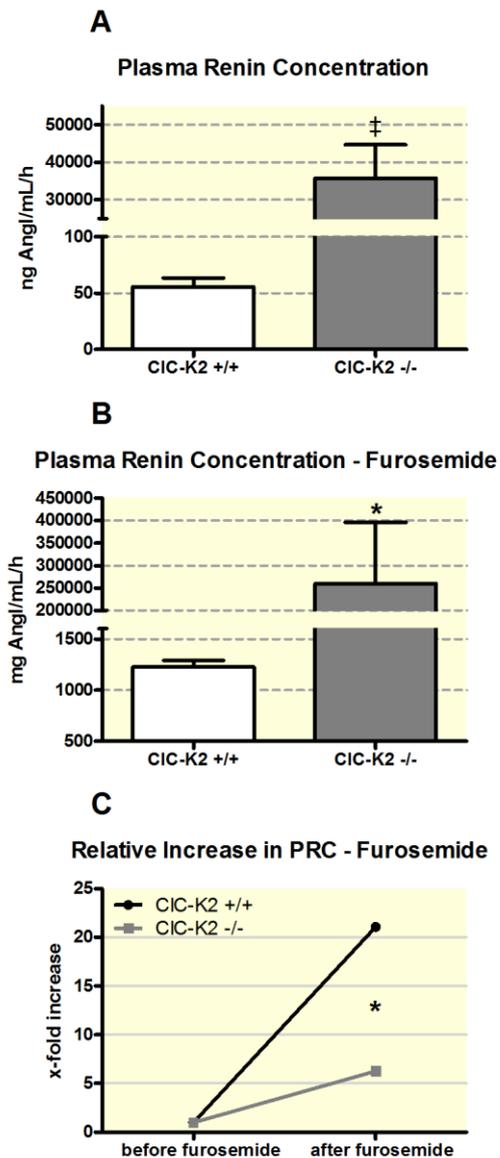


Figure 8. Plasma renin concentration (PRC). (A) Baseline plasma renin concentration (PRC) in conscious CIC-K2^{-/-} and +/+ mice (n=11). (B) PRC 45 minutes after a single i.p. injection of furosemide (40 mg/kg) (n=8). Inset shows the relative change of PRC after the furosemide injection. * indicates p<.05, ‡ indicates p<.001

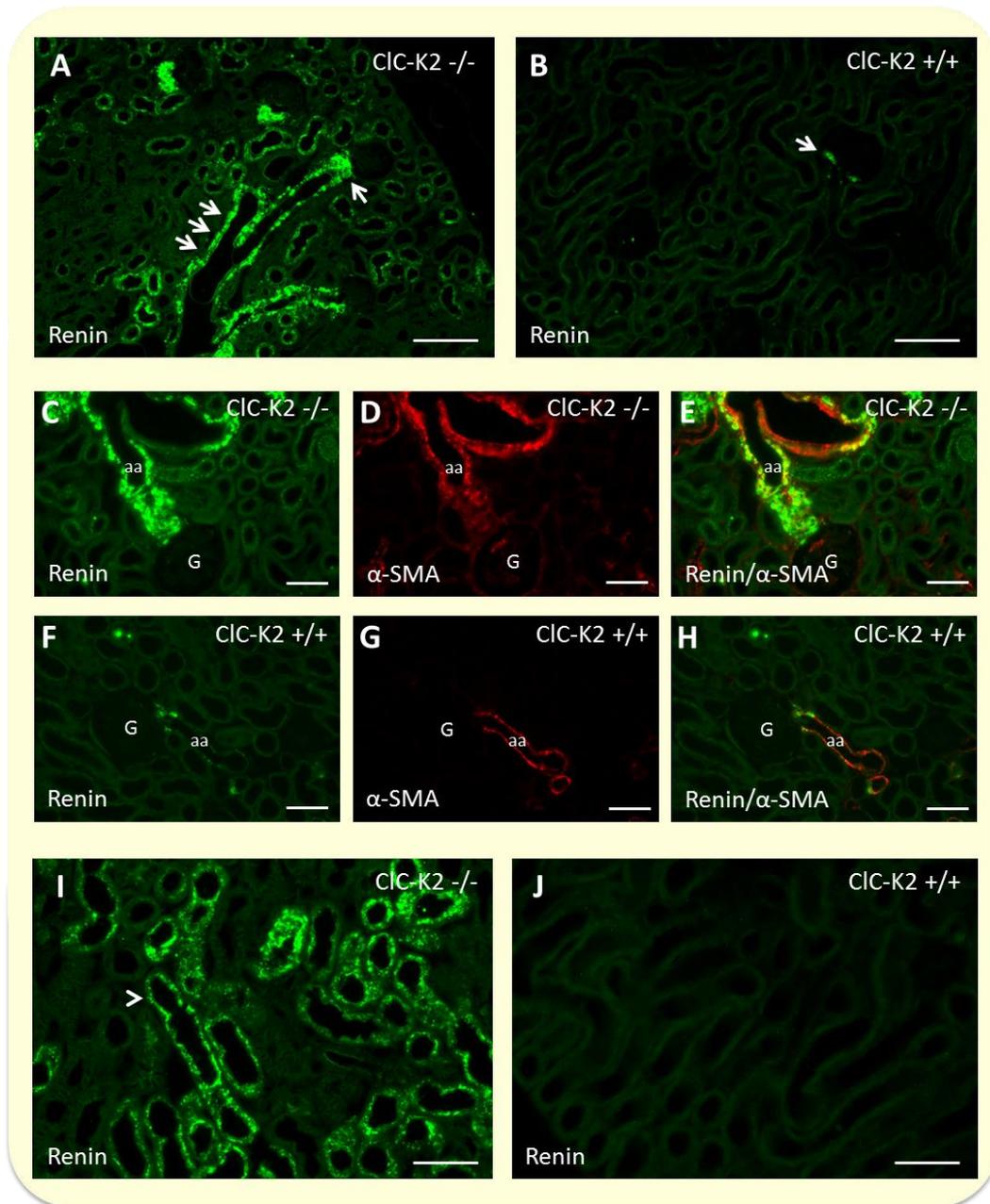


Figure 9. Immunostaining for renin. Immunostaining for renin (green) and α -smooth muscle actin (α -SMA) (red) in kidneys of *Clc-k2*^{-/-} and *Clc-k2*^{+/+} mice. A large number of renin-positive cells (arrows) is present in the cortex of *Clc-k2*^{-/-} mice (A) compared with a few renin-positive cells in *Clc-k2*^{+/+} mice (arrow) (B). Bar = 100 μ m. (C-E) Co-staining of renin and α -SMA showing a large number of renin-positive cells in afferent arterioles and upstream portions of the vascular tree of *Clc-k2*^{-/-} mice (C-E). In *Clc-k2*^{+/+} mice renin-positive cells are restricted to the typical juxtaglomerular position (F-H). Bar = 50 μ m. G, glomerulus; aa, afferent arteriole. (I,J) Immunostaining

for renin in renal tubules (arrowheads) of ClC-K2^{-/-} mice (I) and ClC-K2^{+/+} mice (J).

Bar = 50 μ m.

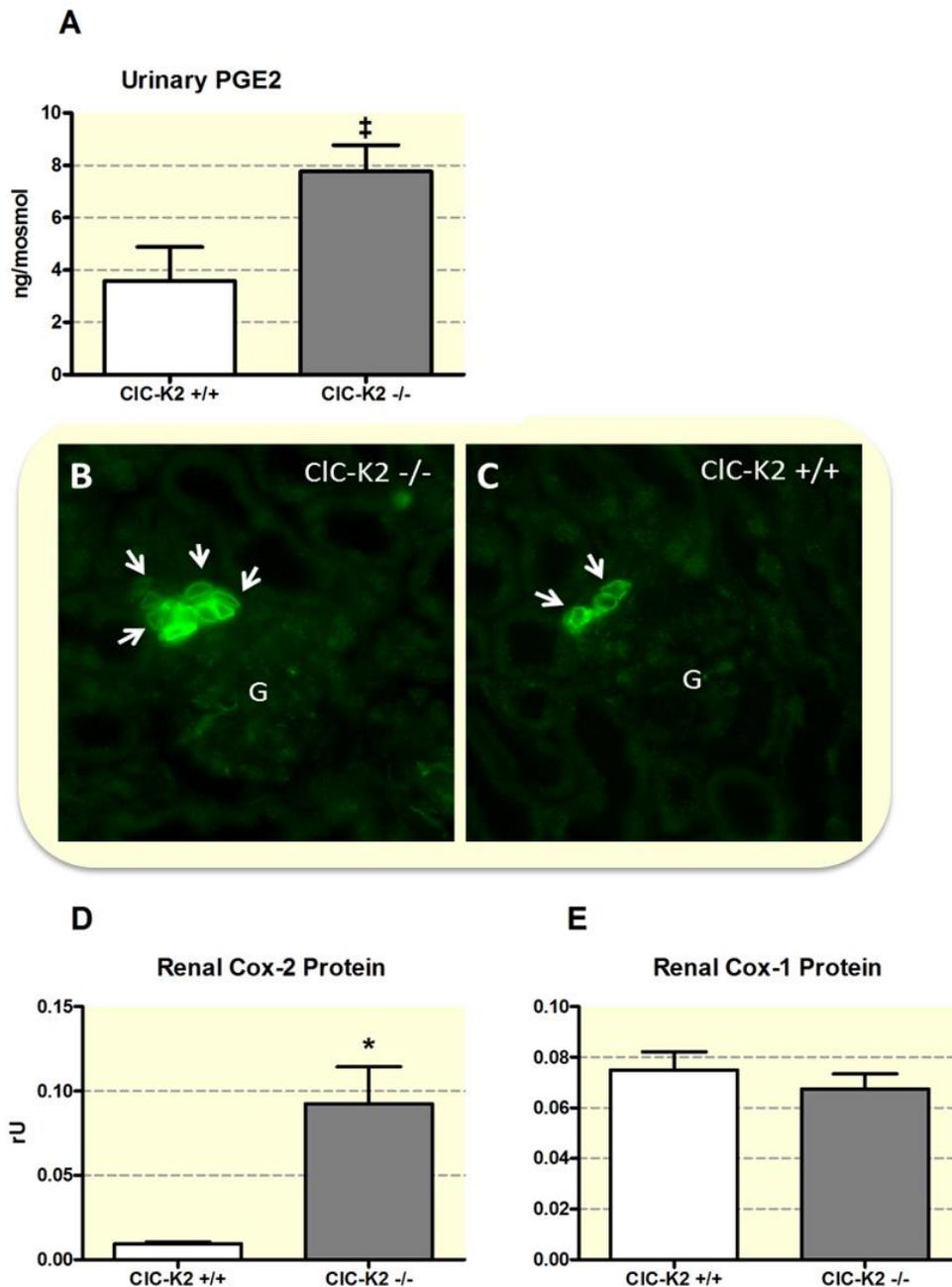


Figure 10. Renal prostaglandin E2 generation. (A) Prostaglandin E2 concentration in spot urine samples normalized to urinary osmolarity in CIC-K2^{-/-} and +/+ mice (n=13). (B,C) Cox-2 immunostaining of the renal cortex of CIC-K2^{-/-} and +/+ mice. Arrows indicate Cox-2-positive cell in the macula densa and adjacent TAL cells. Note the intensity of staining and the recruitment of Cox-2-positive cells in CIC-K2^{-/-} kidneys. G, glomerulus. (D) Cox-2 and (E) Cox-1 protein expression levels of kidneys of CIC-

K2^{-/-} and ^{+/+} mice as detected by western blot analysis (n=6). Ponceau S staining was used to as a loading control. * indicates p<.05, ‡ indicates p<.001

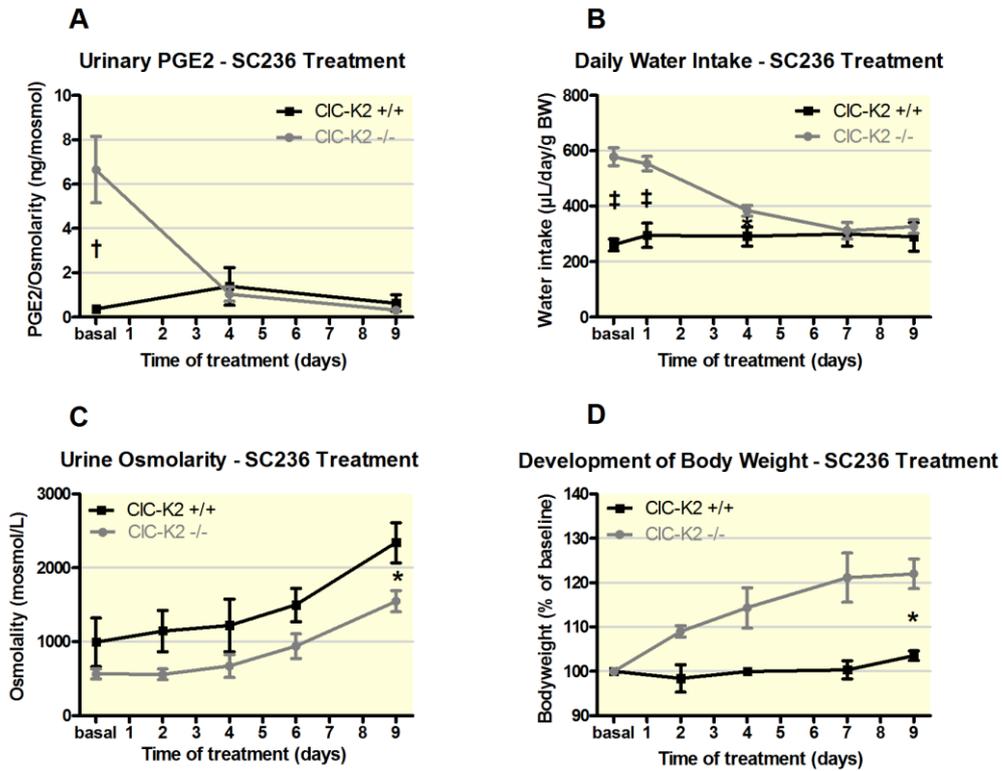


Figure 11. Treatment of CIC-K2^{-/-} and +/+ mice with the specific Cox-2 inhibitor SC-236 (7.5 mg/kg/d). (A) Urinary PGE2 excretion during SC-236 treatment, (B) daily water intake, (C) ambient urine osmolarity, and (D) development of body weight of CIC-K2 deficient mice (n=7) and wild type controls (n=6) during 9 days of SC-236 treatment. * indicates p<.05, † indicates p<.01, ‡ indicates p<.001

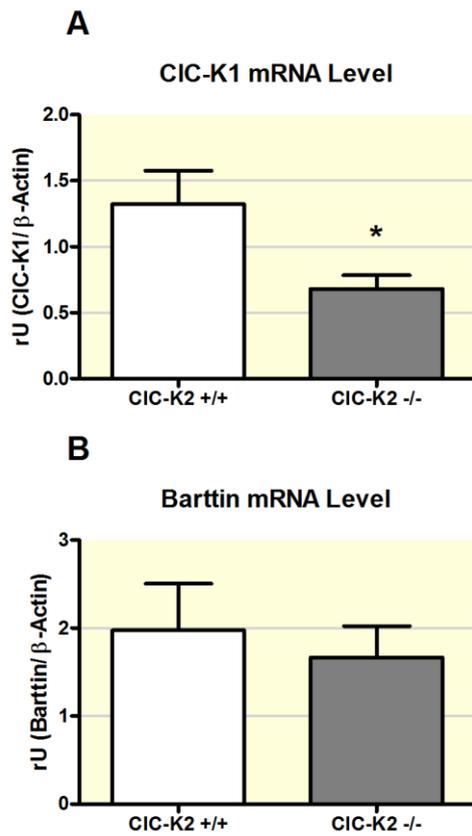


Figure 12. Renal mRNA expression CIC-K1 and Barttin. Relative mRNA abundance of CIC-K1 (A) and Barttin (B) normalized to β -actin as determined by quantitative RT-PCR from total kidney RNA (n=10 for each genotype). * indicates $p < .05$

Table 1

A) Plasma constituents and blood characteristics of ClC-K2 $-/-$ and $+/+$ mice.

	ClCk2 $-/-$	ClCk2 $+/+$	P value
Na ⁺ , mmol/l	143.1 ± 1.5	151.2 ± 3.96	0.1
K ⁺ , mmol/l	3.83 ± 0.07	5.17 ± 0.34	0.02
Cl ⁻ , mmol/l	96.2 ± 1.4	116.6 ± 3.5	0.0003
Ca ²⁺ , mmol/l	2.5 ± 0.17	2.35 ± 0.09	0.44
Mg ²⁺ , mmol/l	1.18 ± 0.03	1.1 ± 0.04	0.16
HPO ₄ ²⁻ /PO ₄ ³⁻ , mmol/l	2.35 ± 0.09	2.17 ± 0.17	0.34
HCO ₃ ⁻ , mmol/l	31.0 ± 5.0	26.2 ± 3.7	0.46
Hematocrit, %	48.6 ± 1.2	44.0 ± 0.5	0.004
Plasma volume, % of bw	2.5 ± 0.6	3.9 ± 0.2	0.02
Blood volume, % of bw	5.5 ± 1.4	8.2 ± 0.4	0.03

B) Urine osmolytes of ClC-K2 $-/-$ and $+/+$ mice under baseline conditions.

	ClCk2 $-/-$	ClCk2 $+/+$	P value
Na ⁺ , μmol/day	190 ± 33	105.4 ± 25.31	0.03
K ⁺ , μmol/day	508 ± 36	213.3 ± 5.4	<0.0001
Cl ⁻ , μmol/day	307 ± 32	220 ± 16	0.03

V. DISKUSSION

Der Austritt von Chloridionen an der basolateralen Seite der Zellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife ist entscheidend für die Resorptionsfunktion dieses Tubulusabschnitts. Da bis heute keine Möglichkeit besteht den CIC-Kb/2 Kanal pharmakologisch und vor allem spezifisch zu blockieren, war es bisher schwierig seine Beteiligung an der Chloridleitfähigkeit des TAL zu untersuchen und andere potenzielle Chlorid-Kanäle zu identifizieren. Deshalb wurde für die vorliegende Arbeit unter Verwendung der TALEN Technik eine CIC-K2 defiziente Mauslinie erzeugt. Die Generierung der Mauslinie erfolgte durch die Firma Cyagen Biosciences, Santa Clara, USA. Die weitere Zucht und der Aufbau eines CIC-K2 $-/-$ Stamms wurde an der Universität Regensburg durchgeführt.

1. Generierung der *Clcnk2* defizienten Mauslinie

Die Phänotypisierung von Mäusen mit einem spezifischen Genknockout hat in unzähligen Fällen einen Einblick in die *in vivo* Funktion einer Reihe dieser Gene liefern können. Die Generierung dieser Tiere ist allerdings ein zeit- und kosten-intensives Unterfangen. Bei „transcription activator-like effector nucleases“ (TALEN) handelt es sich um Fusionsproteine aus einer Endonuklease und einer TAL Effektor-DNA-bindenden Domäne (Miller et al., 2011, Boch et al., 2009). Der Einsatz von TALEN bietet einige Vorteile gegenüber den herkömmlichen Zink-Finger-Nukleasen, obwohl beide Techniken prinzipiell zum gleichen Ergebnis eines Doppelstrangbruchs der DNA führen (Miller et al., 2011). Beispielsweise ist die Effektivität der TALEN Technik so hoch, dass sie keine embryonalen Stammzellen benötigt, sondern die Nukleasen direkt in der befruchteten Eizelle eingesetzt werden können. Andererseits sind die Lokalisation und das Ausmaß der DNA-Deletion nicht komplett vorhersehbar, weil die TALEN verglichen mit Zink-Finger-Nukleasen unspezifisch schneiden (Sung et al., 2013). Bei der Reparatur der DNA durch „non-homologous end joining“ entsteht anschließend eine veränderte DNA-Sequenz. Für die Generierung einer Mauslinie mit Null-Mutation ist die TALEN Technik allerdings ein effizientes, schnelles und Kosten-effektives Instrument (Sung et al., 2013).

Die Firma Cyagen erhielt für das gewünschte Gen *Clcnk2* insgesamt vier Zieltiere, zwei

Weibchen und zwei Männchen, mit heterozygoten Deletionen zwischen einem und elf Basenpaaren in Exon 2 (siehe Figure 1). Für die weitere Zucht verwendeten wir nur ein Männchen mit einer 11-Basenpaaren-Deletion, da dies die Vermehrung zunächst heterozygoter Tiere durch Verpaarung mit C57Bl/6 Weibchen und die anschließende Rückkreuzung zu homozygoten Knockouts beschleunigte. Bei allen vier Zieltieren war von einem funktionellen Knockout aufgrund eines Frameshifts im Zielgen auszugehen. Zusätzlich konnte auf mRNA-Ebene die eventuell vorhandene Translation von verkürzten Proteinen ausgeschlossen werden, da keine mRNA unterhalb von Exon 3 und 4 nachgewiesen werden konnte (siehe Figure 1).

Da der Genlocus für den eng verwandten Anionenkanal Clc-Ka/1 sehr nahe bei dem Zielgenlocus Clcnk2 liegt, bestand die Gefahr, dass möglicherweise beide Clc-K Kanäle von der genetischen Manipulation betroffen sind (Services, 2016). Es konnte aber sowohl bei Wildtypen als auch bei Clc-K2 $-/-$ Mäusen mRNA für Clc-K1 nachgewiesen werden. Da Clc-K Kanäle für ihre Funktion die Untereinheit Barttin benötigen (siehe 2.5 Die Untereinheit Barttin und ihre Bedeutung), wurde die Barttin-Expression ebenfalls untersucht. Die mRNA-Level von Barttin waren bei beiden Genotypen gleich.

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Mauslinie liegt demnach eine Null-Mutation des Clcnk2 Gens vor, die zur fehlenden Biosynthese des Clc-K2 Kanals führt. Der zweite Clc-K Kanal in der Niere, Clc-K1, ist jedoch vorhanden und es sind alle Voraussetzungen für seine Funktionsfähigkeit durch die gegebene Barttin-Expression erfüllt (siehe figure 12).

2. Deutliche Diurese und Natriurese bei Clc-K2 $-/-$ Mäusen

2.1 Salz- und Wasserverlust bei Clc-K2 $-/-$ Mäusen

Einer der Hauptbefunde dieser Arbeit ist die deutlich gesteigerte Diurese und Natriurese der Clc-K2 defizienten Mäuse. Der Salz- und Wasserverlust dieser Tiere ist so stark ausgeprägt, dass sie trotz freiem Zugang zu Trinkwasser hypovolämisch sind. Dies äußert sich in einem im Vergleich zum Wildtyp verringerten Plasmavolumen, einem erhöhten Hämatokritwert und einer Hypotonie (siehe table 1 & figure 8). Verglichen mit NKCC2 defizienten Tieren, einem Modell für Bartter I, war die Salzverlust-Nephropathie der Clc-K2 $-/-$ Tiere dennoch eher dezent. Die NKCC2 $-/-$ Mäuse wiesen

eine Urinosmolarität von 370 mosmol/L auf, was fast der Osmolarität des Plasmas entspricht und keines der NKCC2 $-/-$ Tiere überlebte bis zum Absetzen (Takahashi et al., 2000). Eine ähnlich starke Dysfunktion der Harnkonzentrierung konnte auch bei ROMK $-/-$ Mäusen, einem Bartter II Modell, beobachtet werden, von denen nur 5 % die ersten 21 Tage überlebten (Lorenz et al., 2002). Im Gegensatz zu diesen deutlichen Verlusten starben keine der CIC-K2 $-/-$ Mäuse. Die CIC-K2 $-/-$ Mäuse hatten eine nur leicht reduzierte glomeruläre Filtrationsrate (siehe figure 6), ganz anders als NKCC2 $-/-$ Mäuse, die an einer Niereninsuffizienz litten. Letzteres konnte an den um das Dreifache erhöhten Kreatininwerten der NKCC2 Knockouts festgemacht werden (Takahashi et al., 2000). Verglichen mit den starken Wasserverlusten bei den Tiermodellen für Bartter I und II, korreliert die zwar ernste, aber vergleichsweise mildere Symptomatik der CIC-K2 $-/-$ Mauslinie mit der beim Menschen gemachten Beobachtung über den geringeren Schweregrad der Bartter III Erkrankung (Konrad et al., 2000).

Sowohl bei CIC-K2 $-/-$, als auch bei ROMK $-/-$ und NKCC2 $-/-$ wurden homozygote und heterozygote Merkmalsträger sowie Wildtypen in der erwarteten Mendelschen Verteilung geboren, wenn heterozygote Tiere mit einander gekreuzt wurden (Takahashi et al., 2000, Lorenz et al., 2002). Demnach ist davon auszugehen, dass es in diesen Tiermodellen zu keinen pränatalen Verlusten gekommen ist. Das bei fast allen Formen des humanen Bartter Syndroms auftretende Polyhydramnion und die Frühgeburtlichkeit infolge der starken intrauterinen Polyurie des Fetus, konnten in keinem der drei Tiermodelle nachvollzogen werden (Lorenz et al., 2002, Takahashi et al., 2000). Obwohl das Polyhydramnion ein charakteristisches Symptom bei Bartter ist, trat es möglicherweise aufgrund eines tierartlichen Unterschieds bei den Mäusen nicht auf oder ist bei humanen Patienten durch weitere Faktoren bedingt. Dazu kommt, dass bis heute widersprüchliche Angaben existieren, ob ein Polyhydramnion bei Bartter III überhaupt auftritt oder ob dieses Symptom nicht doch auf die Gruppe der antenatalen Bartter Syndrome, also Bartter I, II und IV, beschränkt ist (Seyberth and Schlingmann, 2011, Brochard et al., 2009, Cruz et al., 2001). Dies scheint wohl zuzutreffen, bedenkt man, dass die Manifestation des klassischen Bartter Syndroms erst im Kindesalter stattfindet (Jeck et al., 2000, Konrad et al., 2000).

2.2 Blutwerte und Urinparameter

Ein weiteres charakteristisches Symptom der Bartter Patienten ist die hypokaliämische Alkalose (Bartter et al., 1962). CIC-K2 $-/-$ Mäuse zeigten eine erniedrigte Plasmakaliumkonzentration, die allerdings noch im unteren Normalbereich für Mäuse

des C57Bl/6 Stammes lag. Passend dazu war die fraktionelle renale Kaliumexkretion bei den ClC-K2 KOs um das Doppelte erhöht (siehe table 1). Die Ursache dieser auch bei Bartter III Patienten typischen Hypokaliämie liegt aus traditioneller Sicht in der erhöhten Kaliumsekretion im Sammelrohr (siehe 3.1.1 Die Pathogenese des Bartter Syndroms) (Kramer et al., 2008). Wie anfangs erwähnt, wird Natrium in den Hauptzellen des Sammelrohrs Aldosteron-abhängig über den apikalen Natrium-Kanal ENaC resorbiert. Ist eine vermehrte Natriumresorption aufgrund eines erhöhten luminalen Natriumgehaltes notwendig, so wird im Austausch für Natrium mehr Kalium apikal abgegeben, um die basolaterale Natrium-Kalium-ATPase anzutreiben (Hropot et al., 1985). Hinzu kommt, dass eine erhöhte Flussrate, zum Beispiel bei Diuretikagabe oder Polyurie im Bartter Syndrom, die luminale Kaliumkonzentration erniedrigt. Das wiederum begünstigt eine apikale Sekretion von Kalium, da sich das Konzentrationsgefälle über die apikale Membran verringert (Engelhardt and Breves, 2005).

Die ClC-K2 $-/-$ Mäuse litten nicht an einer Alkalose, allerdings gab es eine Tendenz zu höheren Bikarbonatwerten in KOs verglichen mit den Wiltypkontrollen (siehe table 1). Die deutliche Streuung der Plasmabikarbonatwerte der Mäuse ist genauso auch bei Menschen zu finden, die von Bartter III betroffen sind. Dabei zeigen einige Patienten eine deutlich ausgeprägte Alkalose, wohingegen andere keine Anzeichen einer Störung des Säure-Basen-Haushaltes aufweisen (Andrini et al., 2014, Zelikovic et al., 2003). Diese große Heterogenität scheint mit der speziellen Art der Mutation des Clcnkb Gens zu korrelieren und mit einer eventuell verbleibenden Restfunktion des ClC-Kb (Andrini et al., 2015). Außerdem spielt beim Menschen auch die sehr stark variierende Ernährung und damit die schwankende Aufnahme von Kalium eine Rolle. Zudem sind Mäuse im Gegensatz zum Menschen möglicherweise resistenter gegen Störungen des Säure-Basen-Haushalts, sodass einige Autoren auch hier einen speziesspezifischen Unterschied als Erklärung vermuten (Schultheis et al., 1998). Passenderweise konnte auch im Modell des Gitelman Syndroms bei NCC $-/-$ Mäusen keine Alkalose festgestellt werden, ebenso wenig bei ClC-K1 $-/-$ Tieren (Schultheis et al., 1998, Matsumura et al., 1999).

3. Die funktionelle Bedeutung des ClC-K2

Um mehr über die Konsequenzen eines Funktionsverlusts des ClC-K2 zu erfahren,

wurden verschiedene Provokationsversuche durchgeführt. Sie zielten darauf ab herauszufinden, inwieweit die Aufkonzentrierung des Urins und die Anpassung an eine reduzierte Natriumaufnahme ohne den Anionenkanal möglich sind. Außerdem sollte die Beteiligung des ClC-Kb/2 an den Resorptionsvorgängen unterschiedlicher Tubulussegmente untersucht werden.

3.1 Provokationsversuch zur Überprüfung der Konzentrierungsfähigkeit: Reaktion auf Wasserentzug

Für eine verbleibende Konzentrierungsfähigkeit der ClC-K2 $-/-$ Mäuse spricht der leichte Anstieg der Urinosmolarität nach 24-stündigem Wasserentzug, der bei NKCC2 $-/-$ Mäusen nicht beobachtet wurde (siehe figure 3) (Takahashi et al., 2000). Bei einem weiteren Tiermodell der Bartter Syndrome, den ROMK $-/-$ Tieren, stieg nach 6 Stunden langem Wasserentzug die Osmolarität des Urins leicht an (Lorenz et al., 2002). Trotzdem kann bei ClC-K2 KOs nur von einer eingeschränkten, nicht von einer komplett erhaltenen Konzentrierungsfähigkeit gesprochen werden, da die Urinosmolarität trotz Anstieg immer noch deutlich unter der der Wildtypkontrollen lag und die ClC-K2 $-/-$ Tiere mehr Körpergewicht verloren haben. Der Gewichtsverlust war jedoch nicht so stark wie bei ClC-K1 defizienten Mäusen (Matsumura et al., 1999).

Die verbleibende Konzentrierungsfähigkeit und der verglichen mit NKCC2 und ROMK defizienten Tieren mildere Salz- und Wasserverlust lassen die Vermutung zu, dass im TAL ein alternativer Chloridausgang zusätzlich zu ClC-Kb/2 an der basolateralen Zellmembran existiert. Ein solcher Alternativweg könnte bei einem Funktionsverlust des ClC-Kb/2 kompensatorisch wirksam werden. Dies ist bei NKCC2 und ROMK nicht möglich, da es keine anderen Kanäle oder Transporter für NaCl und/oder Kalium an der apikalen Seite der TAL-Zellen gibt (siehe 1.5 Der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife: Funktion & Ionttransporter). Naheliegende Kandidaten für eine weitere Chloridleitfähigkeit auf basolateraler Seite sind der fast homologe Anionenkanal ClC-Ka/1 und der Kalium-Chlorid-Cotransporter KCC4 (Di Stefano et al., 2001, Uchida et al., 1995).

Eine Beteiligung des Kalium-Chlorid-Cotransporters KCC4 am alternativen Weg der basolateralen Chloridleitfähigkeit des TAL oder auch des DCT scheint unwahrscheinlich, obwohl KCC4 in beiden Nephronabschnitten an der basolateralen Membran exprimiert ist (Di Stefano et al., 2001). In einer KCC4 $-/-$ Mauslinie konnten Boettger et al. bis auf eine renale tubuläre Azidose mit deutlich alkalischerem Urin im

Vergleich zum Wildtyp keinen renalen Phänotyp diagnostizieren. Die KCC4 $-/-$ Mäuse zeigten äußerlich keinerlei Auffälligkeiten und die Konzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid im Urin der Knockout-Mäuse waren unverändert (Boettger et al., 2002). Die Hauptaufgabe des KCC4 scheint somit eher weiter stromabwärts zu liegen. Es konnte die Expression von KCC4 in den α -interkalierenden Zellen des Sammelrohrs nachgewiesen werden, sodass dieser Kanal eine große Rolle für die H^+ -Sekretion dieser Zellen zu spielen scheint. Für den transepithelialen Salztransport im TAL und DCT ist KCC4 jedoch eher von untergeordneter Bedeutung und trägt wohl nur in sehr geringem Umfang zum basolateralen Austritt von Chlorid in die Blutbahn bei (Boettger et al., 2002).

Der andere mögliche Kandidat für eine Kompensation des ClC-K2 Funktionsverlusts ist der Anionenkanal ClC-Ka/1. Obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass ClC-Ka/1 auf den dünnen Teil der Henle-Schleife beschränkt ist, konnte später ein breiteres Expressionsspektrum dieses Kanals bis in den TAL nachgewiesen werden. Im TAL ist er zusammen mit ClC-Kb/2 auf die basolaterale Zellmembran beschränkt, während er im ATL sowohl apikal als auch basolateral lokalisiert ist (Kramer et al., 2008, Uchida et al., 1993, Uchida et al., 1995, Kieferle et al., 1994). Passend zur vorherrschenden Expression im dünnen Teil der Henle-Schleife, waren ClC-K1 $-/-$ Mäuse nicht fähig den Urin unter Wasserentzug stärker zu konzentrieren und waren darüber hinaus resistent gegen ADH-Gabe. Im Stadium der Euhydratation war ihr Hämatokrit, anders als bei ClC-K2 $-/-$ Mäusen, normal und sie zeigten keine Anzeichen einer Dehydratation, während ClC-K2 KOs bei freiem Zugang zu Trinkwasser bereits hypovolämisch waren. Die Gruppe von Matsumura et al. diagnostizierte bei der ClC-K1 defizienten Mauslinie einen renalen Diabetes insipidus (siehe 2.4 Die Funktion der ClC-K Kanäle) (Matsumura et al., 1999). Der Vergleich des Phänotyps der in dieser Arbeit untersuchten Mauslinie mit der Mauslinie von Matsumura et al. lässt den Schluss zu, dass ClC-Kb/2 im Vergleich zu ClC-Ka/1 in größerem Umfang an der Aufkonzentrierung des Urins und an der NaCl-Rückgewinnung durch die Niere beteiligt ist. Während der Funktionsverlust von ClC-Ka/1 nur zu einer erhöhten Ausscheidung von Wasser führt, ohne weitere Konsequenzen für den Elektrolythaushalt, hat ein Funktionsverlust des ClC-Kb/2 nicht nur einen hochgradigen Wasserverlust zur Folge, sondern beeinträchtigt scheinbar auch die NaCl-Resorption.

3.2 Provokationsversuche mit Diuretika zur Überprüfung der Beteiligung von CIC-Kb/2 an der NaCl-Resorption im TAL und DCT

Um die funktionelle Bedeutung von CIC-K2 für die Resorptionsfunktion der Niere weiter zu untersuchen, wurden den Tieren einmalig verschiedene Diuretika injiziert. Je nach Gruppe des Diuretikums wurden unterschiedliche Tubulusabschnitte außer Funktion gesetzt. Das Schleifendiuretikum Furosemid blockiert den apikalen NKCC2 Transporter im TAL, das Thiaziddiuretikum Hydrochlorothiazid den apikalen NCC Transporter im DCT.

Im Vergleich zu Wildtypkontrollen war die Reaktion der CIC-K2 $-/-$ Mäuse auf das Schleifendiuretikum Furosemid deutlich reduziert. Sie zeigten nur einen schwachen Anstieg des Urinvolumens und einen leichten Abfall der Urinosmolarität (siehe figure 5). Dies lässt einmal mehr vermuten, dass im TAL ein alternativer Ausgang für Chloridionen an der basolateralen Zellmembran existiert. Wie oben bereits erwähnt, handelt es sich dabei vermutlich um den CIC-Ka/1 Kanal. Der alternative Weg scheint vom Expressionslevel des CIC-Ka/1 und auch Barttins unabhängig zu sein, da in CIC-K2 $-/-$ Mäusen auf mRNA-Ebene eine leicht reduzierte Expression von CIC-K1 nachgewiesen wurde (siehe figure 12). Es sollte aber bedacht werden, dass mRNA-Expressionslevel die tatsächliche *in situ* Aktivität nur eingeschränkt widerspiegeln.

Basierend auf einem weiteren *in vivo* Experiment, bei dem das Thiazid Hydrochlorothiazid injiziert wurde, kann ein deutlicher Unterschied zwischen der Zusammensetzung der basolateralen Chloridleitfähigkeit im TAL und im DCT festgestellt werden. Wenngleich die Blockade des apikalen NCC im DCT durch Hydrochlorothiazid (HCTZ) eine deutliche Diurese mit gesteigertem Urinvolumen und reduzierter Urinosmolarität in den Kontrollen hervorgerufen hat, konnte keine Veränderung der beiden Parameter bei CIC-K2 defizienten Mäusen beobachtet werden (siehe figure 5). Auch Patienten, die an Bartter Syndrom Typ III leiden, zeigen dieselbe schwache Reaktion auf Furosemid und eine Resistenz gegen Thiazide (Nozu et al., 2010). Deshalb wird Bartter Typ III auch als gemischter Furosemid-Thiazid-Typ in der pharmakologischen Nomenklatur bezeichnet (Seyberth, 2008). Die ausbleibende Reaktion der CIC-K2 $-/-$ Mäuse zeigt, dass CIC-Kb/2 eine große Bedeutung bei der transepithelialen Resorption von NaCl im DCT hat. Hinzu kommt, dass die komplette Resistenz gegen HCTZ bei Abwesenheit des CIC-K2 darauf hinweist, dass im DCT wohl kein alternativer funktionsfähiger Chloridaustritt an der basolateralen Membran möglich ist. Dies erscheint schlüssig, denn CIC-Ka/1 könnte zwar im TAL den

Funktionsverlust des CIC-K2 kompensieren, ist aber nachweislich nicht im DCT exprimiert und wie oben bereits diskutiert, ist KCC4 wohl nur in vernachlässigbarem Umfang an der Salzresorption im TAL oder DCT beteiligt (Kramer et al., 2008, Uchida et al., 1993, Uchida et al., 1995, Kieferle et al., 1994, Boettger et al., 2002).

Als Hauptursache des Phänotyps bei Bartter III wurde viele Jahre die eingeschränkte Funktion des TAL betrachtet (Simon et al., 1997). Neuere Studien kommen jedoch zu dem Schluss, dass das klassische Bartter Syndrom auch den Erkrankungen des DCT zugeordnet werden sollte (Konrad et al., 2000). Die hier gezeigten Daten zu Versuchen mit Diuretika untermauern diese Hypothese, da CIC-Kb/2 alleinig für die basolaterale Chloridleitfähigkeit des DCT verantwortlich zu sein scheint. Für die Zuteilung zu den DCT-Erkrankungen spricht auch, dass die Symptomatik der Bartter III und Gitelman Patienten häufig kaum auseinander zu halten ist und eine Diagnose erst nach genetischer Analyse möglich ist (Cruz et al., 2001).

Handelt es sich bei Bartter III also um eine reine DCT-Erkrankung, die mit dem Gitelman Syndrom gleichzusetzen ist? Dafür spricht die weite Übereinstimmung der Symptomatik von CIC-K2 und NCC $-/-$ Mäusen. So zeigten beide Modelle beispielsweise keine vorgeburtliche Letalität, eine fehlende Alkalose und eine erhöhte Exkretion von Kalium und Calcium, wobei das Auftreten einer Hypercalciurie typisch für das Gitelman Syndrom ist. Dagegen spricht die deutliche Wachstums- und Entwicklungsstörung der CIC-K2 KOs, die bei NCC $-/-$ Mäusen nie beobachtet wurde. Außerdem zeigen CIC-K2 defiziente Tiere keine Hypomagnesiämie, die für Gitelman pathognomonisch ist (Schultheis et al., 1998).

Ein entscheidender Hinweis für die Einordnung des klassischen Bartter Syndroms zu TAL- oder DCT-bedingten Erkrankungen ergibt sich aus den oben diskutierten Provokationsversuchen mit verschiedenen Diuretika. Das Ausmaß der Einschränkung der NaCl-Konservierung aufgrund eines Funktionsverlusts des CIC-Kb/2 wird aber auch im nachfolgenden Versuchsaufbau mit einer Niedrigsalzdiät deutlich.

3.3 Provokationsversuch zur Natriumkonservierung: Fütterung mit einer Niedrigsalzdiät

Um zu untersuchen, wie stark die CIC-K2 $-/-$ Mäuse Natrium konservieren können, wurden sie mit einer Niedrigsalzdiät (0,01 %) gefüttert. Figure 4 zeigt, dass die KOs ihre ursprünglich erhöhte Natriumexkretion nur bis zu einem gewissen Punkt reduzieren konnten, jedoch nicht das gleiche sehr niedrige Niveau erreichten wie die Wildtypen.

Eine Adaptation scheint in den CIC-K2 defizienten Mäusen nur in einem begrenzten Umfang möglich zu sein, anders als bei NCC $-/-$ Tieren, bei denen die Anpassung an die Nidrigsalzdiät genauso gut funktionierte wie bei den Kontrollen (Schultheis et al., 1998). Der DCT ist nur zu ca. 10 % an der Gesamtresorption von Natrium beteiligt, der TAL aber mit 25 % (siehe Abbildung 1). Ein Funktionsverlust des CIC-Kb/2 führt deshalb zu einer stärkeren Einschränkung der Natriumkonservierung als es bei einem isolierten Funktionsverlust des DCT der Fall wäre, weil im CIC-K2 $-/-$ Modell sowohl der TAL als auch der DCT betroffen sind.

Aus diesem letzten Versuch kann nun endgültig geschlussfolgert werden, dass der Phänotyp der CIC-K2 $-/-$ Maus - und damit in letzter Konsequenz auch der der Bartter III Patienten - sowohl durch die eingeschränkte Funktion des TAL, aber in deutlichem Maß auch vom Funktionsverlust des DCT geprägt ist. Alle in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse sprechen dafür, Bartter III den gemischten TAL-DCT-Erkrankungen zuzuordnen.

4. Kompensationsmechanismen in CIC-K2 $-/-$ Mäusen

Die unter 2. Deutliche Diurese und Natriurese bei CIC-K2 $-/-$ Mäusen bereits diskutierte Symptomatik, der hier beschriebenen Mauslinie mit deutlichem Volumenverlust musste zwangsläufig eine Aktivierung von Kompensationsmechanismen wie dem Renin-Angiotenin-Aldosteron-System nach sich ziehen.

4.1 Beteiligung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Einer der auffälligsten Befunde dieser Arbeit war die um das 500-fache erhöhte Plasmareninkonzentration der CIC-K2 $-/-$ Mäuse (siehe figure 8). Als Quelle der starken Reninproduktion konnte in immunhistologischen Untersuchungen eine massive Rekrutierung von Renin-positiven Zellen entlang der afferenten Arteriole identifiziert werden. Auch noch weiter stromaufwärts waren entlang des Gefäßbaums Renin-positive Zellen zu finden (siehe figure 9). Dieses Phänomen, dass sich mehrere Lagen von Renin-positiven Zellen um ein Gefäß bilden, konnte auch in mehreren anderen Tiermodellen mit chronisch aktivierter Reninsynthese nachvollzogen werden. Sowohl in ACE-, AT1- als auch Angiotensinogen-defizienten Mausstämmen trat übereinstimmend dieses Bild auf. Warum sich die Zellen in dieser Form anordnen, ist bis heute nicht geklärt (Inokuchi et al., 2001, Kihara et al., 1998, Hilgers et al., 1997).

Für die massive Stimulation der Reninproduktion gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen verursacht der Volumenverlust aufgrund der eingeschränkten TAL- und DCT-Funktion die Aktivierung verschiedener systemischer Mechanismen. Dazu gehört die Stimulation des sympathischen Nervensystems, was zu einem Anstieg der Reninsekretion und zur verstärkten Rekrutierung Renin-positiver Zellen führt (Castrop et al., 2010).

Zum anderen führt ein Funktionsverlust des CIC-K2 auch zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Ionenkanäle in den Macula densa Zellen, da diese spezialisierte Zellen des TAL darstellen. Das könnte die Sensorfunktion der Zellen beeinträchtigen, sodass sie einen falsch niedrigen NaCl-Gehalt detektieren und kontinuierlich ein stimulierendes Signal an die Renin-produzierenden Zellen senden (Castrop et al., 2010, Seyberth and Schlingmann, 2011). Für diese Hypothese spricht die deutlich schwächere Zunahme der Plasmareninkonzentration bei CIC-K2 $-/-$ Mäusen nach der Injektion von Furosemid verglichen mit den Wildtypmäusen (siehe figure 9).

Infolge der massiven Aktivierung des Reninsystems und der damit enorm erhöhten Plasmareninkonzentration, konnte immunhistologisch eine Reninexpression im Tubulussystem der CIC-K2 $-/-$ Mäuse beobachtet werden (siehe figure 10). Durch die Co-Färbung mit α -SMA, einem Marker für vaskuläre Strukturen, konnte eine Lokalisation an Gefäßen, die wie oben erwähnt ebenfalls eine Unsumme an Renin-positiven Zellen aufwiesen, ausgeschlossen werden. Die Nierenschnitte von Kontrolltieren wiesen keine Färbung für Renin im Tubulus auf. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein, die zeigen konnten, dass chronisch erhöhte Angiotensin-II-Spiegel zu einem Anstieg der Protein- und mRNA-Level von Renin im distalen Tubulussystem der Niere führten (Gonzalez et al., 2011). Die Wirkung des AngII wurde dabei durch den AT₁-Rezeptor vermittelt und war unabhängig von der ENaC-Aktivität oder einer Aktivierung des Mineralokortikoid-Rezeptors. Ort der vermehrten Reninsynthese waren in diesen Studien die Hauptzellen des Sammelrohrs (Prieto-Carrasquero et al., 2005).

4.2 Bedeutung des Prostaglandin E2 und die Behandlung der CIC-K2 $-/-$ Mäuse

Wie oben erwähnt, zeigten CIC-K2 $-/-$ Mäuse eine hochgradige Hyperreninämie mit massiver Rekrutierung von Renin-positiven Zellen. Der Signalweg zwischen Macula densa Zellen und den Renin-freisetzenden Zellen scheint vor allem auf der gesteigerten

Synthese von Prostaglandin E2 und Prostacyclin zu beruhen (Peti-Peterdi et al., 2003, Harris et al., 1994). Übereinstimmend damit war der Prostaglandingehalt im Urin der CIC-K2 $-/-$ Mäuse um das Vierfache höher im Vergleich zu den Wildtypen (siehe figure 10). Die Hyperprostaglandinurie wird als charakteristisches Symptom der Bartter Patienten angesehen und zur Diagnosestellung verwendet, was dieser Erkrankung den Beinamen Hyperprostaglandin-E2-Syndrom einbrachte (Bartter, 1977, Nusing and Seyberth, 2004). Passenderweise konnte auch in anderen Tiermodellen der Bartter Syndrome eine erhöhte Ausscheidung von PGE2 mit dem Urin nachgewiesen werden, so zum Beispiel in der NKCC2 defizienten Mauslinie (Takahashi et al., 2000). Ursache der vermehrten PGE2-Produktion in der CIC-K2 $-/-$ Mauslinie war nicht die Cyclooxygenase I sondern die Cyclooxygenase II, deren Expression in der Niere der KOs um ein vielfaches über die Kontrolle heraufreguliert war (siehe figure 11). Bezüglich der Lokalisation der erhöhten Cox II-Aktivität zeigten Nierenschnitte von CIC-K2 KOs eine Hyperplasie der Cox II-positiven Zellen in juxtaglomerulärer Position am Glomerulus (siehe figure 10). Eine Hyperplasie und Hypertrophie des juxtaglomerulären Apparates war eines der ursprünglichen Symptome anhand dessen Frederic Bartter bereits 1962 das nach ihm benannte Syndrom diagnostizierte und definiert (Bartter et al., 1962).

Wie bereits erwähnt ist die Hyperprostaglandinurie ein typisches Symptom bei Bartter III und damit auch einer der entscheidenden Ansatzpunkte bei der Therapie der Patienten. Unter Behandlung mit SC-236, einem spezifischen Cox II-Inhibitor (Mederle et al., 2015), konnte die Symptomatik der CIC-K2 $-/-$ Mäuse deutlich verbessert werden. Der Einsatz eines selektiven Cox II-Inhibitors erschien nach dem oben diskutierten Vorbefund einer erhöhten Expression von Cox II naheliegend. SC-236 verringerte die Polyurie der KOs und sorgte für einen Anstieg der Urinosmolarität und des Körpergewichts (siehe figure 11). Bartter III Patienten profitieren ähnlich stark von einer Behandlung mit nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID), unabhängig von der jeweiligen Art ihrer Mutation. Obwohl der genaue Mechanismus dieser positiven Wirkung der NSAIDs nicht vollständig bekannt ist, so ist es doch naheliegend, dass eine Reduktion der durch PGE2 vermittelten natriuretischen und diuretischen Effekte dafür verantwortlich ist (siehe figure 11 sowie Abbildung 9) (Breyer and Breyer, 2000). Das am häufigsten verwendete NSAID bei Bartter Patienten ist Indomethacin, ein nicht-selektiver Cox-Hemmer. Groß angelegte Studien konnten keinen Unterschied in der positiven Wirkung zwischen selektiven und nicht-selektiven Cox-Hemmern nachweisen

(Vaisbich et al., 2004). Dennoch ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit die Wahl eines selektiven Cox II-Inhibitors zu favorisieren, zumal Arzneimittel dieser Gruppe weniger gastrointestinale Nebenwirkungen verursachen (Vaisbich et al., 2004).

5. Übereinstimmung zwischen CIC-K2 -/- Maus und Bartter III

Als klassisches Bartter Syndrom oder auch Bartter III wird eine Salzverlusttubulopathie mit hypokaliämischer Alkalose, Wachstumsstörung, Hyperprostaglandinurie und normalem bis niedrigem Blutdruck beschrieben. Die in dieser Arbeit untersuchte Mauslinie mit Nullmutation des *Clnk2* Gens, wies zwar verringerte Plasmakaliumspiegel auf, aber keine Alkalose. Wie oben bereits diskutiert, könnte die Ursache in einem tierartlichen Unterscheid liegen. Von Anfang an war bei den KOs dieser Mauslinie ein deutliches Wachstumsdefizit zu beobachten, sodass sie in jedem Alter leichter und kleiner waren als ihre Wildtypgeschwister. Entwicklungs- und Wachstumsstörungen unterscheiden Bartter III von den übrigen Bartter Subtypen. Passend zu Bartter III zeigten CIC-K2 -/- Mäuse eine Polyurie mit erhöhter Ausscheidung von Natrium und Chlorid, sowie Prostaglandin E₂. Der dadurch entstehende Volumenverlust führte wie bei humanen Patienten zu einer massiven Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Verglichen mit anderen Tiermodellen der Bartter Syndrome, genauer dem Tiermodell für Bartter I, II und IV, war die Symptomatik dieser Mauslinie insgesamt milder. Auch dies entspricht der im Verhältnis zu den anderen Bartter Syndromen milderen Klinik der Bartter III Patienten. Die Symptomatik der CIC-K2 -/- Mäuse konnte durch die Applikation eines selektiven Cox II-Inhibitors deutlich verbessert werden, so wie es auch bei Bartter Patienten unter NSAIDs der Fall ist. Damit spiegeln diese Mäuse in fast allen Aspekten das klinische Erscheinungsbild des Bartter Syndroms Typ III wider (Konrad et al., 2000). In Abbildung 11 ist eine Übersicht zur Übereinstimmung zwischen CIC-K2 -/- Mäusen und Bartter III Patienten gegeben.

	CIC-K2 -/- Mauslinie	Bartter III Patienten
Polyurie	✓	✓
Hypokaliämie	✓	✓
Alkalose	x	✓
Wachstumsstörung	✓	✓
Hypernatriämie	✓	✓
Hyperprostaglandinurie	✓	✓
Hypotonie	✓	✓
Aktivierung des RAAS	✓	✓
Verbesserung der Symptomatik durch Cox-Inhibitoren	✓	✓
reduzierte GFR	✓	✓
fehlendes Polyhydramnion	✓	✓

Abbildung 11 Zusammenfassung der Übereinstimmung zwischen der untersuchten CIC-K2 defizienten Mauslinie und Bartter III Patienten.

Eine entscheidende Einschränkung hat das hier untersuchte Tiermodell jedoch: es kann nur eine ganz bestimmte Art der Mutation des *Clcnk2* bzw. *Clcnkb* nachbilden, nämlich eine Nullmutation dieses Gens. Ursprünglich wurden alle Veränderungen, die zu einem kompletten Funktionsverlust des CIC-Kb Kanals führen, als Bartter Typ III bezeichnet. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Ansatz um eine sehr vereinfachte Zuteilung handelt. Unter den etwa 20 funktionell untersuchten Mutationen konnte nicht nur der komplette Verlust der CIC-Kb Funktion nachgewiesen werden, sondern auch eine nur leicht reduzierte Aktivität, eine reduzierte Oberflächenexpression und eine veränderte Sensitivität gegenüber Calcium und pH-Wert (Andrini et al., 2014, Andrini et al., 2015). Diese individuellen Unterschiede resultieren aus der Natur der jeweiligen genetischen Mutation. Dazu kommt, dass in vielen Studien nicht nur eine isolierte Mutation des *Clcnkb* Gens nachgewiesen wurde, sondern die untersuchten Patienten weitere genetische Veränderung aufwiesen. Fukuyama et al. fanden in mehreren Patienten verschiedene Kombinationen an Mutationen des CIC-Kb, *NKCC2* und *NCC* (Fukuyama et al., 2003). All dies sind mögliche Erklärungsansätze für die große Heterogenität des Bartter III Syndroms.

Ein Beispiel für die unterschiedliche Auswirkung verschiedener Mutationen des gleichen Gens ist der Vergleich zwischen dem gezielten Verlust des *NKCC2* in der einen Mauslinie und der zufälligen Mutation des zugrunde liegenden Gens in der anderen Mauslinie. Während bei Takahashi et al. ein kompletter Funktionsverlust des

NKCC2 vorlag, sorgte die spontane Mutation bei Kemters Gruppe zwar für eine beeinträchtigte Transportfunktion, dennoch war von einer Restaktivität des NKCC2 auszugehen (Takahashi et al., 2000, Kemter et al., 2010). Die zufällige Mutation bei Kemter et al. führte zu einem deutlich milderem Phänotyp ohne Aktivierung des RAAS und zu überlebensfähigen Tieren, die dennoch an einer deutlichen Polyurie mit erhöhter Calcium- und Magnesiumausscheidung litten (Kemter et al., 2010). Der gezielte NKCC2-Verlust bei Takahashi et al. verursachte eine hochgradige Dehydratation, die innerhalb der ersten Tage *post partum* zum Tod der Jungtiere führte (Takahashi et al., 2000). Obwohl ein Großteil der Bartter I Patienten eine stark ausgeprägte Symptomatik zeigt, wurde vor einiger Zeit auch ein milderer Phänotyp bei Patienten mit reduzierter Transportfunktion des NKCC2 beschrieben (Simon et al., 1996a, Pressler et al., 2006). Letztere werden ebenfalls dem Bartter Typ I zugeordnet, dennoch machten sich ihre Symptome erst in der Pubertät bemerkbar. Bei diesen Patienten handelt es sich also um eine späte Manifestation des Bartter Syndrom Typ I (Pressler et al., 2006). Die zwei verschiedenen Mauslinien stellen demnach zwei unterschiedliche Ausprägungsformen der Erkrankung dar, die allgemein unter dem Begriff des Bartter Typ I zusammengefasst wird.

Der hier charakterisierte Phänotyp der ClC-K2 defizienten Mauslinie zeigt nur die Korrelation zwischen einem genetisch bedingten kompletten Funktionsverlust des ClC-Kb/2 und dessen klinischer Ausprägung auf und liefert so *in vivo* Einblicke in die Bedeutung dieses Kanals für die Nierenfunktion. Die breite Vielfalt der humanen Erkrankung kann die Mauslinie jedoch nur eingeschränkt nachbilden, da bei Bartter III bisher keine Mutations-Hotspots bekannt sind.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Der Anionenkanal ClC-Kb/2 ermöglicht die Chloridresorption an der basolateralen Membran der Tubulusepithelzellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife und der Pars convoluta des distalen Tubulus der Niere. Funktionelle Mutationen des für diesen Kanal kodierenden Clcnkb Gens sind assoziiert mit dem humanen Bartter Syndrom Typ III. Dabei handelt es sich um eine autosomal rezessiv-vererbte Salzverlusttubulopathie mit hypokaliämischer Alkalose, Entwicklungsstörung, Polyurie und Hyperprostaglandinurie sowie sekundärem Hyperaldosteronismus. Um die Regulations- und Resorptionsfunktion des ClC-Kb/2 Kanals *in vivo* zu untersuchen, wurde für die vorliegende Arbeit eine ClC-K2 defiziente Mauslinie generiert. Dies geschah durch die Firma Cyagen Biosciences, Santa Clara, USA, mittels der TALEN Technik. Die ClC-K2 defizienten Tiere wurden in der erwarteten Mendelschen Verteilung geboren und waren alle überlebensfähig. Allerdings zeigten KOs von Beginn an eine Wachstums- und Entwicklungsstörung. Das 24h Urinvolumen war bei ClC-K2 -/- Tieren um das Vierfache erhöht gegenüber den Wildtypen. Dementsprechend war auch die Urinosmolarität deutlich reduziert. Während eines 24-stündigen Wasserentzugs zeigten KOs nur einen leichten Anstieg der Urinosmolarität und einen deutlich höheren Verlust des Körpergewichts im Vergleich zu den Wildtypen. Die renale Natriumausscheidung war bei ClC-K2 -/- Mäusen größer und die Natriumkonservierung im Nidrigsalzdiät-Versuch merklich eingeschränkt. Der Salzverlust der ClC-K2 -/- Mäuse zog ein reduziertes Plasmavolumen, erniedrigten Blutdruck, eine leicht verringerte glomeruläre Filtrationsrate, eine erhöhte renale Prostaglandin-E2-Synthese und eine massive Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems nach sich. Außerdem zeigten die KOs eine reduzierte Sensitivität für das Schleifendiuretikum Furosemid und eine komplette Resistenz gegen das Thiazid Hydrochlorothiazid.

Abschließend lässt sich sagen, dass die hier untersuchten ClC-K2 defizienten Mäuse in fast allen Aspekten das humane Bartter Syndrom Typ III widerspiegeln. Im Vergleich zu anderen Tiermodellen der übrigen Bartter Syndrome, besonders bezüglich des letalen Phänotyps der NKCC2- und ROMK-defizienten Stämme, war der Phänotyp dieser Mauslinie weniger schwerwiegend. Dieser geringere Schweregrad ist vergleichbar mit der Situation der Bartter III Patienten.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der ClC-Kb/2 Kanal großen Anteil an der

transepithelialen Salzresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und an der renalen Konzentrierungsfähigkeit hat. Die noch verbleibende Restfunktion des TAL in *ClC-K2* defizienten Mäusen, lässt die Vermutung zu, dass hier ein alternativer Chloridausgang an der basolateralen Seite existiert. Am wahrscheinlichsten handelt es sich hierbei um den nahe verwandten *ClC-Ka/1* Kanal. Anders als im TAL, scheint *ClC-Kb/2* in der Pars convoluta des distalen Tubulus alleine für die basolaterale Chloridleitfähigkeit verantwortlich zu sein und folglich ist die Salzresorption in diesem Nephronabschnitt direkt von der Funktionsfähigkeit des *ClC-Kb/2* abhängig.

VII. SUMMARY

The anion channel ClC-Kb/2 facilitates chloride reabsorption at the basolateral membrane of tubule cells in the thick ascending limb of loop of Henle and the distal convoluted tubule of the kidney. Functional mutations in the gene *Clcnkb*, encoding for ClC-Kb, are associated with human Bartter's syndrome type III. Bartter type III is an autosomal recessive salt-losing tubulopathy with hypocaliemic alkalosis, failure to thrive, polyuria and hyperprostaglandinuria as well as secondary hyperaldosteronism. To address the regulatory and reabsorptive function of ClC-Kb/2 *in vivo*, a ClC-K2 deficient mouse line was generated for this thesis. This was performed by Cyagen Biosciences, Santa Clara, USA, with the use of TALEN technology. ClC-K2 deficient mice were born in the expected Mendelian ratio and all mice were viable. But from the start KO mice showed growth retardation and failure to thrive. 24-hrs urine volume was four-fold increased in ClC-K2 *-/-* mice compared to wildtypes. Accordingly, urine osmolarity was reduced. During 24-hrs of water deprivation, KO mice exhibited only a slight increase in urine osmolarity accompanied by a higher loss of body weight compared to wildtype controls. Renal sodium excretion was elevated in ClC-K2 deficient mice and sodium conservation was compromised under low salt diet. Loss of salt in ClC-K2 *-/-* mice lead to a reduced plasma volume, hypotension, a slightly reduced glomerular filtration rate, an increased renal prostaglandin E2 synthesis and a massively activated renin-angiotensin system. Furthermore KO mice showed a reduced sensitivity to the loop diuretic furosemide and were completely resistant to thiazides.

In summary the thesis could show, that this ClC-K2 *-/-* mouse line in almost every aspect mirrors the clinical picture of patients suffering from Bartter's syndrome type III. In comparison to mouse models of other Bartter types, in particular compared to the virtually lethal phenotype of NKCC2- and ROMK-deficient mice, the phenotype of ClC-K2 *-/-* mice was less severe. This degree of severity is similar to the situation in type III Bartter's patients.

Furthermore it could be shown that the ClC-Kb/2 channel markedly contributes to the transepithelial salt reabsorption in the thick ascending limb of Henle's loop and above to the renal concentrating ability. The residual TAL function in ClC-K2 deficient mice suggests the existence of an alternative chloride exit at the basolateral cell membrane in the TAL. The most likely candidate is the closely related ClC-Ka/1 channel. Unlike to

the TAL, ClC-Kb/2 appears to exclusively facilitate basolateral chloride conductance in the distal convoluted tubule and, consequently, salt reabsorption in this nephron segment fully depends on the intact ClC-Kb/2 function.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Akizuki, N., Uchida, S., Sasaki, S. & Marumo, F. 2001. Impaired solute accumulation in inner medulla of *Clcnk1*^{-/-} mice kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, **280**, F79-87.

Al Shibli, A. & Narchi, H. 2015. Bartter and Gitelman syndromes: Spectrum of clinical manifestations caused by different mutations. *World J Methodol*, **5**, 55-61.

Andrini, O., Keck, M., Briones, R., Lourdel, S., Vargas-Poussou, R. & Teulon, J. 2015. ClC-K chloride channels: emerging pathophysiology of Bartter syndrome type 3. *Am J Physiol Renal Physiol*, **308**, F1324-34.

Andrini, O., Keck, M., L'Hoste, S., Briones, R., Mansour-Hendili, L., Grand, T., Sepulveda, F. V., Blanchard, A., Lourdel, S., Vargas-Poussou, R. & Teulon, J. 2014. CLCNKB mutations causing mild Bartter syndrome profoundly alter the pH and Ca²⁺ dependence of ClC-Kb channels. *Pflugers Arch*, **466**, 1713-23.

Barlassina, C., Dal Fiume, C., Lanzani, C., Manunta, P., Guffanti, G., Ruello, A., Bianchi, G., Del Vecchio, L., Macciardi, F. & Cusi, D. 2007. Common genetic variants and haplotypes in renal CLCNKA gene are associated to salt-sensitive hypertension. *Hum Mol Genet*, **16**, 1630-8.

Bartter, F. C. 1977. Bartter's syndrome. *Urol Clin North Am*, **4**, 253-61.

Bartter, F. C., Pronove, P., Gill, J. R., Jr. & Maccardle, R. C. 1962. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. *Am J Med*, **33**, 811-28.

Bateman, A. 1997. The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci*, **22**, 12-3.

Bell, D. S. 2009. Successful utilization of aliskiren, a direct renin inhibitor in Bartter syndrome. *South Med J*, **102**, 413-5.

Bettinelli, A., Borsa, N., Bellantuono, R., Syren, M. L., Calabrese, R., Edefonti, A., Komninos, J., Santostefano, M., Beccaria, L., Pela, I., Bianchetti, M. G. & Tedeschi, S. 2007. Patients with biallelic mutations in the chloride channel gene *CLCNKB*: long-term management and outcome. *Am J Kidney Dis*, **49**, 91-8.

Birkenhager, R., Otto, E., Schurmann, M. J., Vollmer, M., Ruf, E. M., Maier-Lutz, I., Beekmann, F., Fekete, A., Omran, H., Feldmann, D., Milford, D. V., Jeck, N., Konrad, M., Landau, D., Knoers, N. V., Antignac, C., *et al.* 2001. Mutation of *BSND* causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet*, **29**, 310-4.

Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A. & Bonas, U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, **326**, 1509-12.

Boettger, T., Hubner, C. A., Maier, H., Rust, M. B., Beck, F. X. & Jentsch, T. J. 2002. Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter *Kcc4*. *Nature*, **416**, 874-8.

Breyer, M. D. & Breyer, R. M. 2000. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, **279**, F12-23.

Brochard, K., Boyer, O., Blanchard, A., Loirat, C., Niaudet, P., Macher, M. A., Deschenes, G., Bensman, A., Decramer, S., Cochat, P., Morin, D., Broux, F., Caillez, M., Guyot, C., Novo, R., Jeunemaitre, X., *et al.* 2009. Phenotype-genotype correlation in antenatal and neonatal variants of Bartter syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, **24**, 1455-64.

Carrithers, S. L., Ott, C. E., Hill, M. J., Johnson, B. R., Cai, W., Chang, J. J., Shah, R. G., Sun, C., Mann, E. A., Fonteles, M. C., Forte, L. R., Jackson, B. A., Giannella, R. A. & Greenberg, R. N. 2004. Guanylin and uroguanylin induce natriuresis in mice lacking guanylyl cyclase-C receptor. *Kidney Int*, **65**, 40-53.

Castrop, H., Hocherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V. & Wagner, C. 2010. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev*, **90**, 607-73.

Castrop, H., Kramer, B. K., Riegger, G. A., Kurtz, A. & Wolf, K. 2000. Overexpression of chloride channel CLC-K2 mRNA in the renal medulla of Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens*, **18**, 1289-95.

Chadha, V. & Alon, U. S. 2009. Hereditary renal tubular disorders. *Semin Nephrol*, **29**, 399-411.

Cruz, D. N., Shaer, A. J., Bia, M. J., Lifton, R. P., Simon, D. B., Yale, G. s. & Bartter's Syndrome Collaborative Study, G. 2001. Gitelman's syndrome revisited: an evaluation of symptoms and health-related quality of life. *Kidney Int*, **59**, 710-7.

Deng, A., Wead, L. M. & Blantz, R. C. 2004. Temporal adaptation of tubuloglomerular feedback: effects of COX-2. *Kidney Int*, **66**, 2348-53.

Di Stefano, A., Jounier, S. & Wittner, M. 2001. Evidence supporting a role for KCl cotransporter in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int*, **60**, 1809-23.

Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T. & MacKinnon, R. 2002. X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, **415**, 287-94.

Eknoyan, G. 2010. A history of diabetes insipidus: paving the road to internal water balance. *Am J Kidney Dis*, **56**, 1175-83.

Ellison, D. H. 2000. Divalent cation transport by the distal nephron: insights from Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am J Physiol Renal Physiol*, **279**, F616-25.

Engelhardt, W. v. & Breves, G. 2005. Physiologie der Haustiere. *Enke*.

Estevez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhager, R., Otto, E., Hildebrandt, F. & Jentsch, T. J. 2001. Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature*, **414**, 558-61.

Fahlke, C. & Fischer, M. 2010. Physiology and pathophysiology of ClC-K/barttin channels. *Front Physiol*, **1**, 155.

Fukuyama, S., Okudaira, S., Yamazato, S., Yamazato, M. & Ohta, T. 2003. Analysis of renal tubular electrolyte transporter genes in seven patients with hypokalemic metabolic alkalosis. *Kidney Int*, **64**, 808-16.

Garcia-Nieto, V., Flores, C., Luis-Yanes, M. I., Gallego, E., Villar, J. & Claverie-Martin, F. 2006. Mutation G47R in the BSND gene causes Bartter syndrome with deafness in two Spanish families. *Pediatr Nephrol*, **21**, 643-8.

Gonzalez, A. A., Liu, L., Lara, L. S., Seth, D. M., Navar, L. G. & Prieto, M. C. 2011. Angiotensin II stimulates renin in inner medullary collecting duct cells via protein kinase C and independent of epithelial sodium channel and mineralocorticoid receptor activity. *Hypertension*, **57**, 594-9.

Gradogna, A., Babini, E., Picollo, A. & Pusch, M. 2010. A regulatory calcium-binding site at the subunit interface of CLC-K kidney chloride channels. *J Gen Physiol*, **136**, 311-23.

Gradogna, A., Fenollar-Ferrer, C., Forrest, L. R. & Pusch, M. 2012. Dissecting a regulatory calcium-binding site of CLC-K kidney chloride channels. *J Gen Physiol*, **140**, 681-96.

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

Hannan, F. M. & Thakker, R. V. 2013. Calcium-sensing receptor (CaSR) mutations and disorders of calcium, electrolyte and water metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **27**, 359-71.

Harris, R. C., McKanna, J. A., Akai, Y., Jacobson, H. R., Dubois, R. N. & Breyer, M. D. 1994. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and

increases with salt restriction. *J Clin Invest*, **94**, 2504-10.

Hayama, A., Rai, T., Sasaki, S. & Uchida, S. 2003. Molecular mechanisms of Bartter syndrome caused by mutations in the BSND gene. *Histochem Cell Biol*, **119**, 485-93.

Hene, R. J., Koomans, H. A., Dorhout Mees, E. J., vd Stolpe, A., Verhoef, G. E. & Boer, P. 1987. Correction of hypokalemia in Bartter's syndrome by enalapril. *Am J Kidney Dis*, **9**, 200-5.

Hilgers, K. F., Reddi, V., Krege, J. H., Smithies, O. & Gomez, R. A. 1997. Aberrant renal vascular morphology and renin expression in mutant mice lacking angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*, **29**, 216-21.

Hropot, M., Fowler, N., Karlmark, B. & Giebisch, G. 1985. Tubular action of diuretics: distal effects on electrolyte transport and acidification. *Kidney Int*, **28**, 477-89.

Hufnagle, K. G., Khan, S. N., Penn, D., Cacciarelli, A. & Williams, P. 1982. Renal calcifications: a complication of long-term furosemide therapy in preterm infants. *Pediatrics*, **70**, 360-3.

Inokuchi, S., Kimura, K., Sugaya, T., Inokuchi, K., Murakami, K. & Sakai, T. 2001. Hyperplastic vascular smooth muscle cells of the intrarenal arteries in angiotensin II type 1a receptor null mutant mice. *Kidney Int*, **60**, 722-31.

Janssen, A. G., Scholl, U., Domeyer, C., Nothmann, D., Leinenweber, A. & Fahlke, C. 2009. Disease-causing dysfunctions of barttin in Bartter syndrome type IV. *J Am Soc Nephrol*, **20**, 145-53.

Jeck, N., Konrad, M., Peters, M., Weber, S., Bonzel, K. E. & Seyberth, H. W. 2000. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype. *Pediatr Res*, **48**, 754-8.

Jeck, N., Reinalter, S. C., Henne, T., Marg, W., Mallmann, R., Pasel, K., Vollmer, M.,

Klaus, G., Leonhardt, A., Seyberth, H. W. & Konrad, M. 2001. Hypokalemic salt-losing tubulopathy with chronic renal failure and sensorineural deafness. *Pediatrics*, **108**, E5.

Jeck, N., Schlingmann, K. P., Reinalter, S. C., Komhoff, M., Peters, M., Waldegger, S. & Seyberth, H. W. 2005. Salt handling in the distal nephron: lessons learned from inherited human disorders. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **288**, R782-95.

Jeck, N., Waldegger, P., Doroszewicz, J., Seyberth, H. & Waldegger, S. 2004a. A common sequence variation of the CLCNKB gene strongly activates ClC-Kb chloride channel activity. *Kidney Int*, **65**, 190-7.

Jeck, N., Waldegger, S., Lampert, A., Boehmer, C., Waldegger, P., Lang, P. A., Wissinger, B., Friedrich, B., Rislér, T., Moehle, R., Lang, U. E., Zill, P., Bondy, B., Schaeffeler, E., Asante-Poku, S., Seyberth, H., *et al.* 2004b. Activating mutation of the renal epithelial chloride channel ClC-Kb predisposing to hypertension. *Hypertension*, **43**, 1175-81.

Jentsch, T. J. 2008. ClC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **43**, 3-36.

Jentsch, T. J., Steinmeyer, K. & Schwarz, G. 1990. Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature*, **348**, 510-4.

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. 2010. 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*, **298**, F1405-15.

Kieferle, S., Fong, P., Bens, M., Vandewalle, A. & Jentsch, T. J. 1994. Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6943-7.

Kihara, M., Umemura, S., Sumida, Y., Yokoyama, N., Yabana, M., Nyui, N., Tamura, K., Murakami, K., Fukamizu, A. & Ishii, M. 1998. Genetic deficiency of angiotensinogen produces an impaired urine concentrating ability in mice. *Kidney Int*, **53**, 548-55.

Klein, J. D., Le Quach, D., Cole, J. M., Disher, K., Mongiu, A. K., Wang, X., Bernstein, K. E. & Sands, J. M. 2002. Impaired urine concentration and absence of tissue ACE: involvement of medullary transport proteins. *Am J Physiol Renal Physiol*, **283**, F517-24.

Kleta, R. & Bockenhauer, D. 2006. Bartter syndromes and other salt-losing tubulopathies. *Nephron Physiol*, **104**, p73-80.

Knoers, N. V. & Levtchenko, E. N. 2008. Gitelman syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, **3**, 22.

Komhoff, M., Tekesin, I., Peters, M., Leonhard, A. & Seyberth, H. W. 2005. Perinatal management of a preterm neonate affected by hyperprostaglandin E2 syndrome (HPS). *Acta Paediatr*, **94**, 1690-3.

Konrad, M., Vollmer, M., Lemmink, H. H., van den Heuvel, L. P., Jeck, N., Vargas-Poussou, R., Lakings, A., Ruf, R., Deschenes, G., Antignac, C., Guay-Woodford, L., Knoers, N. V., Seyberth, H. W., Feldmann, D. & Hildebrandt, F. 2000. Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol*, **11**, 1449-59.

Kramer, B. K., Bergler, T., Stoelcker, B. & Waldegger, S. 2008. Mechanisms of Disease: the kidney-specific chloride channels CLCKA and CLCKB, the Barttin subunit, and their clinical relevance. *Nat Clin Pract Nephrol*, **4**, 38-46.

Kuhlmann, U., Boehler, J., Luft, F. C., Alscher, M. D. & Kunzendorf, U. 2008. Nephrologie Pathophysiologie-Klinik-Nierenersatzverfahren. *Thieme*.

L'Hoste, S., Diakov, A., Andrini, O., Genete, M., Pinelli, L., Grand, T., Keck, M.,

Paulais, M., Beck, L., Korbmacher, C., Teulon, J. & Lourdel, S. 2013. Characterization of the mouse CLC-K1/Barttin chloride channel. *Biochim Biophys Acta*, **1828**, 2399-409.

Lang, F., Vallon, V., Knipper, M. & Wangemann, P. 2007. Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. *Am J Physiol Cell Physiol*, **293**, C1187-208.

Lee, B. H., Cho, H. Y., Lee, H., Han, K. H., Kang, H. G., Ha, I. S., Lee, J. H., Park, Y. S., Shin, J. I., Lee, D. Y., Kim, S. Y., Choi, Y. & Cheong, H. I. 2012. Genetic basis of Bartter syndrome in Korea. *Nephrol Dial Transplant*, **27**, 1516-21.

Liaw, L. C., Banerjee, K. & Coulthard, M. G. 1999. Dose related growth response to indometacin in Gitelman syndrome. *Arch Dis Child*, **81**, 508-10.

Liu, W., Morimoto, T., Kondo, Y., Iinuma, K., Uchida, S., Sasaki, S., Marumo, F. & Imai, M. 2002. Analysis of NaCl transport in thin ascending limb of Henle's loop in CLC-K1 null mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, **282**, F451-7.

Lorenz, J. N., Baird, N. R., Judd, L. M., Noonan, W. T., Andringa, A., Doetschman, T., Manning, P. A., Liu, L. H., Miller, M. L. & Shull, G. E. 2002. Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome. *J Biol Chem*, **277**, 37871-80.

Lourdel, S., Paulais, M., Marvao, P., Nissant, A. & Teulon, J. 2003. A chloride channel at the basolateral membrane of the distal-convoluted tubule: a candidate CLC-K channel. *J Gen Physiol*, **121**, 287-300.

Malafrente, C., Borsa, N., Tedeschi, S., Syren, M. L., Stucchi, S., Bianchetti, M. G., Achilli, F. & Bettinelli, A. 2004. Cardiac arrhythmias due to severe hypokalemia in a patient with classic Bartter disease. *Pediatr Nephrol*, **19**, 1413-5.

Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S. B., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S. & Marumo, F. 1999. Overt nephrogenic

diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat Genet*, **21**, 95-8.

Matsunoshita, N., Nozu, K., Shono, A., Nozu, Y., Fu, X. J., Morisada, N., Kamiyoshi, N., Ohtsubo, H., Ninchoji, T., Minamikawa, S., Yamamura, T., Nakanishi, K., Yoshikawa, N., Shima, Y., Kaito, H. & Iijima, K. 2016. Differential diagnosis of Bartter syndrome, Gitelman syndrome, and pseudo-Bartter/Gitelman syndrome based on clinical characteristics. *Genet Med*, **18**, 180-8.

Mederle, K., Meurer, M., Castrop, H. & Hocherl, K. 2015. Inhibition of COX-1 attenuates the formation of thromboxane A2 and ameliorates the acute decrease in glomerular filtration rate in endotoxemic mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, **309**, F332-40.

Miller, C. 1982. Open-state substructure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **299**, 401-11.

Miller, C. & White, M. M. 1984. Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 2772-5.

Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., Dulay, G. P., Hua, K. L., Ankoudinova, I., Cost, G. J., Urnov, F. D., Zhang, H. S., *et al.* 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, **29**, 143-8.

Nickel, R., Schummer, A. & Seiferle, E. 2004. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. *Parey*.

Nozu, K., Iijima, K., Kanda, K., Nakanishi, K., Yoshikawa, N., Satomura, K., Kaito, H., Hashimura, Y., Ninchoji, T., Komatsu, H., Kamei, K., Miyashita, R., Kugo, M., Ohashi, H., Yamazaki, H., Mabe, H., *et al.* 2010. The pharmacological characteristics of molecular-based inherited salt-losing tubulopathies. *J Clin Endocrinol Metab*, **95**, E511-8.

Nusing, R. M., Reinalter, S. C., Peters, M., Komhoff, M. & Seyberth, H. W. 2001. Pathogenetic role of cyclooxygenase-2 in hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome: therapeutic use of the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide. *Clin Pharmacol Ther*, **70**, 384-90.

Nusing, R. M. & Seyberth, H. W. 2004. The role of cyclooxygenases and prostanoid receptors in furosemide-like salt losing tubulopathy: the hyperprostaglandin E syndrome. *Acta Physiol Scand*, **181**, 523-8.

Pape, H.-C., Kurtz, A. & Silbernagel, S. 2014. Physiologie. *Thieme*, 1024.

Peters, M., Jeck, N., Reinalter, S., Leonhardt, A., Tonshoff, B., Klaus, G. G., Konrad, M. & Seyberth, H. W. 2002. Clinical presentation of genetically defined patients with hypokalemic salt-losing tubulopathies. *Am J Med*, **112**, 183-90.

Peti-Peterdi, J. & Harris, R. C. 2010. Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. *J Am Soc Nephrol*, **21**, 1093-6.

Peti-Peterdi, J., Komlosi, P., Fuson, A. L., Guan, Y., Schneider, A., Qi, Z., Redha, R., Rosivall, L., Breyer, M. D. & Bell, P. D. 2003. Luminal NaCl delivery regulates basolateral PGE₂ release from macula densa cells. *J Clin Invest*, **112**, 76-82.

Phillips, D. R., Ahmad, K. I., Waller, S. J., Meisner, P. & Karet, F. E. 2006. A serum potassium level above 10 mmol/l in a patient predisposed to hypokalemia. *Nat Clin Pract Nephrol*, **2**, 340-6; quiz 347.

Pressler, C. A., Heinzinger, J., Jeck, N., Waldegger, P., Pechmann, U., Reinalter, S., Konrad, M., Beetz, R., Seyberth, H. W. & Waldegger, S. 2006. Late-onset manifestation of antenatal Bartter syndrome as a result of residual function of the mutated renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter. *J Am Soc Nephrol*, **17**, 2136-42.

Prieto-Carrasquero, M. C., Kobori, H., Ozawa, Y., Gutierrez, A., Seth, D. & Navar, L. G. 2005. AT1 receptor-mediated enhancement of collecting duct renin in angiotensin II-

dependent hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, **289**, F632-7.

Proesmans, W., Devlieger, H., Van Assche, A., Eggermont, E., Vandenberghe, K., Lemmens, F., Sieprath, P. & Lijnen, P. 1985. Bartter syndrome in two siblings--antenatal and neonatal observations. *Int J Pediatr Nephrol*, **6**, 63-70.

Reinalter, S. C., Grone, H. J., Konrad, M., Seyberth, H. W. & Klaus, G. 2001. Evaluation of long-term treatment with indomethacin in hereditary hypokalemic salt-losing tubulopathies. *J Pediatr*, **139**, 398-406.

Reinalter, S. C., Jeck, N., Brochhausen, C., Watzer, B., Nusing, R. M., Seyberth, H. W. & Komhoff, M. 2002. Role of cyclooxygenase-2 in hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome. *Kidney Int*, **62**, 253-60.

Rickheit, G., Maier, H., Strenzke, N., Andreescu, C. E., De Zeeuw, C. I., Muenscher, A., Zdebik, A. A. & Jentsch, T. J. 2008. Endocochlear potential depends on Cl⁻ channels: mechanism underlying deafness in Bartter syndrome IV. *EMBO J*, **27**, 2907-17.

Schachter, A. D., Arbus, G. S., Alexander, R. J. & Balfe, J. W. 1998. Non-steroidal anti-inflammatory drug-associated nephrotoxicity in Bartter syndrome. *Pediatr Nephrol*, **12**, 775-7.

Schlingmann, K. P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsum, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., Syrrou, M., Nielsen, S., Sassen, M., Waldegger, S., Seyberth, H. W. & Konrad, M. 2002. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet*, **31**, 166-70.

Schnermann, J. 1998. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol*, **274**, R263-79.

Schnermann, J. & Sayegh, S. 1998. *Kidney Physiology*. Lippincott - Raven, 200.

Scholl, U., Hebeisen, S., Janssen, A. G., Muller-Newen, G., Alekov, A. & Fahlke, C. 2006. Barttin modulates trafficking and function of ClC-K channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11411-6.

Schultheis, P. J., Lorenz, J. N., Meneton, P., Nieman, M. L., Riddle, T. M., Flagella, M., Duffy, J. J., Doetschman, T., Miller, M. L. & Shull, G. E. 1998. Phenotype resembling Gitelman's syndrome in mice lacking the apical Na⁺-Cl⁻ cotransporter of the distal convoluted tubule. *J Biol Chem*, **273**, 29150-5.

Schweda, F., Friis, U., Wagner, C., Skott, O. & Kurtz, A. 2007. Renin release. *Physiology (Bethesda)*, **22**, 310-9.

Scognamiglio, R., Negut, C. & Calo, L. A. 2007. Aborted sudden cardiac death in two patients with Bartter's/Gitelman's syndromes. *Clin Nephrol*, **67**, 193-7.

Seidel, C., Reinalter, S., Seyberth, H. W. & Scharer, K. 1995. Pre-pubertal growth in the hyperprostaglandin E syndrome. *Pediatr Nephrol*, **9**, 723-8.

Services, U. S. D. o. H. H. 2016. Genetics Home Reference at U.S. national library of medicine.

Seyberth, H. W. 2008. An improved terminology and classification of Bartter-like syndromes. *Nat Clin Pract Nephrol*, **4**, 560-7.

Seyberth, H. W. & Schlingmann, K. P. 2011. Bartter- and Gitelman-like syndromes: salt-losing tubulopathies with loop or DCT defects. *Pediatr Nephrol*, **26**, 1789-802.

Simon, D. B., Bindra, R. S., Mansfield, T. A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J. M., Sanjad, S. A., Taylor, C. M., Pilz, D., Brem, A., *et al.* 1997. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat Genet*, **17**, 171-8.

Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., DiPietro, A., Sanjad, S. A. & Lifton, R. P. 1996a. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet*, **13**, 183-8.

Simon, D. B., Karet, F. E., Rodriguez-Soriano, J., Hamdan, J. H., DiPietro, A., Trachtman, H., Sanjad, S. A. & Lifton, R. P. 1996b. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. *Nat Genet*, **14**, 152-6.

Simon, D. B., Nelson-Williams, C., Bia, M. J., Ellison, D., Karet, F. E., Molina, A. M., Vaara, I., Iwata, F., Cushner, H. M., Koolen, M., Gainza, F. J., Gitelman, H. J. & Lifton, R. P. 1996c. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet*, **12**, 24-30.

Stauber, T., Weinert, S. & Jentsch, T. J. 2012. Cell biology and physiology of CLC chloride channels and transporters. *Compr Physiol*, **2**, 1701-44.

Stolting, G., Fischer, M. & Fahlke, C. 2014. CLC channel function and dysfunction in health and disease. *Front Physiol*, **5**, 378.

Sung, Y. H., Baek, I. J., Kim, D. H., Jeon, J., Lee, J., Lee, K., Jeong, D., Kim, J. S. & Lee, H. W. 2013. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol*, **31**, 23-4.

Tajima, M., Hayama, A., Rai, T., Sasaki, S. & Uchida, S. 2007. Barttin binds to the outer lateral surface of the ClC-K2 chloride channel. *Biochem Biophys Res Commun*, **362**, 858-64.

Takahashi, N., Chernavvsky, D. R., Gomez, R. A., Igarashi, P., Gitelman, H. J. & Smithies, O. 2000. Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5434-9.

Therapeutics, A. C. o. E. R. o. 2010. QT drug list by risk groups: drugs that prolong the

QT interval and/or induce torsades de points ventricular arrhythmia.

Uchida, S. & Sasaki, S. 2005. Function of chloride channels in the kidney. *Annu Rev Physiol*, **67**, 759-78.

Uchida, S., Sasaki, S., Furukawa, T., Hiraoka, M., Imai, T., Hirata, Y. & Marumo, F. 1993. Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J Biol Chem*, **268**, 3821-4.

Uchida, S., Sasaki, S., Nitta, K., Uchida, K., Horita, S., Nihei, H. & Marumo, F. 1995. Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1. *J Clin Invest*, **95**, 104-13.

Vaisbich, M. H., Fujimura, M. D. & Koch, V. H. 2004. Bartter syndrome: benefits and side effects of long-term treatment. *Pediatr Nephrol*, **19**, 858-63.

van de Stolpe, A., Verhoef, G. E., Hene, R. J., Koomans, H. A. & van der Vijver, J. C. 1987. Total body potassium in Bartter's syndrome before and during treatment with enalapril. *Nephron*, **45**, 122-5.

Vandewalle, A., Cluzeaud, F., Bens, M., Kieferle, S., Steinmeyer, K. & Jentsch, T. J. 1997. Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney. *Am J Physiol*, **272**, F678-88.

Vitzthum, H., Castrop, H., Meier-Meitinger, M., Riegger, G. A., Kurtz, A., Kramer, B. K. & Wolf, K. 2002. Nephron specific regulation of chloride channel CLC-K2 mRNA in the rat. *Kidney Int*, **61**, 547-54.

Waldegger, S., Jeck, N., Barth, P., Peters, M., Vitzthum, H., Wolf, K., Kurtz, A., Konrad, M. & Seyberth, H. W. 2002. Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels. *Pflugers Arch*, **444**, 411-8.

Waldegger, S. & Jentsch, T. J. 2000. Functional and structural analysis of ClC-K

chloride channels involved in renal disease. *J Biol Chem*, **275**, 24527-33.

Watanabe, S., Fukumoto, S., Chang, H., Takeuchi, Y., Hasegawa, Y., Okazaki, R., Chikatsu, N. & Fujita, T. 2002. Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome. *Lancet*, **360**, 692-4.

Wolf, K., Castrop, H., Riegger, G. A., Kurtz, A. & Kramer, B. K. 2001. Differential gene regulation of renal salt entry pathways by salt load in the distal nephron of the rat. *Pflugers Arch*, **442**, 498-504.

Zaika, O., Tomilin, V., Mamenko, M., Bhalla, V. & Pochynyuk, O. 2016. New perspective of ClC-Kb/2 Cl- channel physiology in the distal renal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, **310**, F923-30.

Zelikovic, I., Szargel, R., Hawash, A., Labay, V., Hatib, I., Cohen, N. & Nakhoul, F. 2003. A novel mutation in the chloride channel gene, CLCNKB, as a cause of Gitelman and Bartter syndromes. *Kidney Int*, **63**, 24-32.

IX. ANHANG

1. Publikationen und Präsentationen

Publikationen

- 1.) Salt-Losing Nephropathy in Mice with a Null Mutation of the Clcnk2 Gene.

Grill A, Schießl IM, Gess B, Fremter K, Hammer A, Castrop H.

Acta Physiol (Oxf). 2016 Jul 16. [Epub ahead of print]

- 2.) The angiotensin receptor-associated protein Atrap is a stimulator of the cardiac Ca²⁺-ATPase SERCA2a.

Mederle K, Gess B, Pluteanu F, Plackic J, Tiefenbach KJ, Grill A, Kockskämper J, Castrop H.

Cardiovasc Res. 2016 Jun 1;110(3):359-70. Epub 2016 Mar 25.

Präsentationen: Auszüge dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert

April 2016 Experimental Biology, San Diego, CA, USA

Vortrag & Poster: “Salt-Losing Nephropathy in Mice with a Null Mutation of the Clcnkb Gene“

Meritorious Research Award der American Physiological Society
– Epithelial Transport Group

April 2016 Junge Niere, Frankfurt am Main

Vortrag: Salzverlusttubulopathie in einer Mauslinie mit Null-Mutation den Clcnkb Gens

Abstractpreis und Vortragspreis der DGfN

Sept. 2016 Kongress der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin

Vortrag: Best of Junge Niere 2016: Salzverlusttubulopathie in einer Mauslinie mit Null-Mutation den Clcnkb Gens

Reisestipendium der DGfN

2. **Abbildungs-und Tabellenverzeichnis**

<i>Abbildung 1 Resorptionsvorgänge von Wasser und Elektrolyten entlang des Nephrons im Zustand der Antidiurese, sowie Lagebeziehung des Glomerulums (rot) und der Macula densa Zellen (grün). Die Prozentangaben beziehen sich auf die noch vorhandene Menge im Verhältnis zur ursprünglich filtrierten Menge („load“). Je nach Plasmakonzentration wird Kalium im distalen Nephronabschnitt resorbiert oder sezerniert (Engelhardt and Breves, 2005). Die einzelnen Nephronabschnitte sind in grau benannt.....</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 2 Resorption von Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium und Magnesium im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife mit Darstellung der Ionentransporter und -kanäle an der apikalen und basolateralen Zellmembran.....</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 3 Resorption von Natrium, Kalium und Chlorid in der frühen Pars convoluta des distalen Tubulus (DCT1); Darstellung ohne die Resorption von Calcium und Magnesium.</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 4 Modell des ClC-Kb Kanals, entnommen aus (Andrini et al., 2015) Seitenansicht der Dimerstruktur des ClC-Kb Kanals. Die Abgrenzung der Zellmembran ist als gepunktete Linie, die Monomere sind in orange und blau eingezeichnet. Die Pore des linken Monomers ist als hellgrauer Kanal abgebildet. Grüne Kugeln stellen die Ca²⁺-Bindungsstelle, pinke Kugeln die H⁺-Bindungsstelle dar.....</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 5 Expressionsmuster des ClC-Ka/1 (blau) und ClC-Kb/2 (rot) entlang des Nephrons.....</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 6 Übersicht über die Pathogenese bei Bartter I bis III und der daraus resultierenden Symptome.....</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 7 Pathogenese des Bartter Syndroms auf Zellebene. Jeweils eine Zelle des TAL und des DCT mit ihren Ionentransportern und –kanälen ist vergrößert dargestellt. (Ellison, 2000) (A) zeigt die Resorptionsvorgänge in einem gesunden TAL bzw. DCT. (B) zeigt die Vorgänge beim Bartter Syndrom, wo der NaCl-Transport im TAL zum Erliegen gekommen ist. Damit sinkt das transepitheliale Potenzial und es findet keine Calcium- und Magnesiumresorption mehr statt. Durch den erhöhten luminalen Elektrolytgehalt kommt es außerdem zu einer Hypertrophie des nachgeschalteten DCT:</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 8 Bekannte Mutationen des ClC-Kb Kanals assoziiert mit Bartter III. (Andrini et al., 2015) Die Lokalisation der Mutationen ist an einem Modell des Proteins dargestellt, indem Rechtecke die α-Helices abbilden. Der untere Teil des Modells liegt</i>	

intrazellulär, der obere extrazellulär. Großbuchstaben stehen für die Helices, CBS für die Cystation- β -Synthase Domäne. Jeder Kreis steht für eine bekannte Mutation. 29

Abbildung 9 Übersicht der Pathogenese des Gitelman Syndroms und der daraus resultierenden Symptome..... 32

Abbildung 10 Pathogenese des Gitelman Syndroms auf Zellebene. Jeweils eine Zelle des DCT1 und DCT2 ist vergrößert dargestellt. (Ellison, 2000)..... 33

Abbildung 11 Zusammenfassung der Übereinstimmung zwischen der untersuchten ClC-K2 defizienten Mauslinie und Bartter III Patienten. 94

3. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria, Arterie
Aa.	Arteriae, Arterien
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ADH	Antidiuretisches Hormon
AngII	Angiotensin II
AT1	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT2	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
ATL	Absteigender dünner Teil der Henle-Schleife
ATP	Adenosintri-phosphat
BSND	Barttin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CASR	Calcium-sensing receptor Gen
CBS	Cystationin-beta-Synthase
CD	Sammelrohr
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid
CIC	Chlorid channel, Anionenkanal
CIC-K	Nierenspezifischer Anionenkanal
CIC-K1	Muriner nierenspezifischer Anionenkanal 1
CIC-K2	Muriner nierenspezifischer Anionenkanal 2
CIC-Ka	Humaner nierenspezifischer Anionenkanal 1

CIC-Ka/1	Humaner und muriner nierenspezifischer Anionenkanal 1
CIC-Kb	Humaner nierenspezifischer Anionenkanal 2
CIC-Kb/2	Humaner und muriner nierenspezifischer Anionenkanal 2
Clcnk1	Gen des CIC-K1
Clcnk2	Gen des CIC-K2
Clcnka	Gen des CIC-Ka
Clcnkb	Gen des CIC-Kb
CNT	Verbindungstubulus
Cox	Cyclooxygenase
Cox I	Cyclooxygenase I
Cox II	Cyclooxygenase II
DCT	Pars convoluta des distalen Tubulus
DCT1	Pars convoluta Teil 1 des distalen Tubulus
DCT2	Pars convoluta Teil 2 des distalen Tubulus
DTL	Intermediärtubulus, Pars descendens
ENaC	Epithelialer Natrium-Kanal
et al.	und andere (et alii)
GFP	Grünes Fluoreszenzprotein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O	Wasser
HCTZ	Hydrochlorothiazid
K ⁺	Kalium
KCC4	Kalium-Chlorid-Cotransporter
KCNJ1	Gen des ROMK

Kir	Kalium Kanal
KO	Knockout
MD	Macula densa
Mg ²⁺	Magnesium
mmHg	Druckeinheit, 1mmHg = Druck, den 1 mm Quecksilbersäule erhebt
mRNA	messenger ribonucleic acid
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NCC	Natrium-Chlorid-Cotransporter
NCX1	3Na ⁺ /1Ca ²⁺ - Austauscher
NKCC2	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 2
NSAID	Nicht steroidales Antiphlogistikum
PCT	Proximalen Tubulus, Pars convoluta
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMCA1b	Ca ²⁺ -ATPase
pS	Pikosievert
PST	Pars recta des proximalen Tubulus
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROMK	Kalium-Kanal
SLC12A1	Gen des NKCC2
TAL	Dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife
TALEN	transcription activator-like effector nuclease
TGF	Tubuloglomerulärer Feedback
TRPM6	Mg ²⁺ -Kanal
TRPV5	Ca ²⁺ - Kanäle

USA	United States of America
V.	Vena, Vene
Vv.	Venae, Venen
ZNS	Zentrales Nervensystem
α	alpha
β	beta

4. Erklärung zum Copyright

Abbildung 4: die Zeitschrift „American Journal of Physiology- Renal Physiology“ gestattet freundlicherweise die direkte Übernahme dieser Abbildung zur Veröffentlichung in Dissertationsschriften.

(Originalartikel: <http://ajprenal.physiology.org/content/308/12/F1324>)

Abbildung 6: die Zeitschrift „American Journal of Physiology- Renal Physiology“ gestattet freundlicherweise die direkte Übernahme dieser Abbildung zur Veröffentlichung in Dissertationsschriften.

(Originalartikel: <http://ajprenal.physiology.org/content/279/4/F616>)

Abbildung 8: die Zeitschrift „American Journal of Physiology- Renal Physiology“ gestattet freundlicherweise die direkte Übernahme dieser Abbildung zur Veröffentlichung in Dissertationsschriften.

(Originalartikel: <http://ajprenal.physiology.org/content/308/12/F1324>)

Abbildung 9: die Zeitschrift „American Journal of Physiology- Renal Physiology“ gestattet freundlicherweise die direkte Übernahme dieser Abbildung zur Veröffentlichung in Dissertationsschriften.

(Originalartikel: <http://ajprenal.physiology.org/content/279/4/F616>)

5. Erklärung zur Beteiligung der Koautoren an der Publikation „Salt-Losing Nephropathy in Mice with a Null Mutation of the Clnk2 Gene“

Die Koautoren Ina Maria Schießl, Bernhard Gess, Katharina Fremter, Anna Hammer und Prof. Dr. Hayo Castrop erklären sich mit der Veröffentlichung des oben genannten Artikels im Rahmen dieser Doktorarbeit bereit.

Die Autoren war vollgengermaßen an der Veröffentlichung beteiligt:

Studiendesign und -planung: Prof. Dr. Hayo Castrop und Alexandra Grill

Durchführung der *in vivo* Experimente: die Untersuchungen im Stoffwechselkäfig mit Nidrigsalzdiät wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ina Maria Schießl, Katharina Fremter und Anna Hammer durchgeführt

Durchführung der RT-PCR: Katharina Fremter und Alexandra Grill

Durchführung der Western Blots: Bernhard Gess

Verfassen des Manuskriptes: Erstellung des Manuskriptes und aller Abbildungen in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Hayo Castrop

X. DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Hayo Castrop für die Überlassung dieses Themas bedanken. Seine Unterstützung und konstruktive Kritik haben diese Arbeit so weit gebracht und mein Interesse und meine Begeisterung für die Arbeit in der Forschung nachhaltig beeinflusst.

Herrn Prof. Dr. Wanke danke ich für die Übernahme der Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und seine freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Ina Maria Schießl für ihre Hilfestellung beim Erlernen unzähliger neuer Methoden und ihre offenes Ohr bei jeglichem Problem.

Meiner ehemaligen Studienkollegin und späteren Mitdoktorandin Anna Hammer danke ich für ihre Freundschaft und Kameradschaft. Auch bei Dr. Janina Staffel und Simone Buchtler möchte ich mich für die lustigen Stunden im Labor und in den Mittagspausen bedanken, die einen wunderbaren Ausgleich an stressigen Arbeitstagen dargestellt haben. Wie heißt es so schön, geteiltes Leid ist halbes Leid.

Für die wundervolle Betreuung meiner Versuchstiere und die Hilfe bei unzähligen Versuchen möchte ich mich ganz herzlich bei Katharina Fremter und Bernhard Gess bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie, die hier nicht namentlich erwähnt werden können, möchte ich für die freundliche und produktive Atmosphäre und die Zusammenarbeit während meiner Doktorandenzeit danken.

Meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Tante danke ich an dieser Stelle für ihre Unterstützung sowohl in emotionaler als auch in finanzieller Hinsicht. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meinem Lebensgefährten Andreas Lemmer danke ich für seine Liebe, seine Nachsicht und seinen Beistand. Er ist mit Sicherheit der Elektroingenieur mit dem fundiertesten Wissen über den Anionenkanal ClC-K2 – unfreiwilligerweise.