

Aus dem Physiologischen Institut
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Markus Bleich)
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Veränderungen im Metabolismus und renal-tubuläre
Kompensationsmechanismen in alten Mäusen mit
lebenslangem Defekt im Elektrolyttransport der dicken
aufsteigenden Henle Schleife durch Claudin-16
Knockdown**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Jan-Eike Behrends
aus Wildeshausen

Kiel
2015

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Markus Bleich

2. Berichtstatter: Prof. Dr. H. Schöcklmann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2016

Zum Druck genehmigt: Kiel, den gez.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Epithelphysiologie	8
1.1.1	Aufbau und Funktionen von Epithelien	8
1.1.2	Das Membranpotenzial	9
1.1.3	Transportmechanismen	10
1.1.4	Claudine	11
1.2	Nierenphysiologie.....	12
1.2.1	Histologische Gliederung	12
1.2.2	Dicker aufsteigender Teil der Henle Schleife	13
1.2.3	Distales Konvolut	14
1.2.4	Sammelrohr	15
1.3	Die Claudin-16 Knockdown Maus	18
1.3.1	Unterdrückung der Claudin-16 Expression.....	18
1.3.2	FHHNC, der Bezug zur Klinik.....	19
1.4	Hormone und Regulationsmechanismen	20
1.4.1	Elektrolyt- und Wasserhaushalt	20
1.4.2	Die Niere und der Calcium- und Magnesiumhaushalt	21
1.5	Renaler Ammoniak-Haushalt	23
1.6	Niere im Alter	24
1.7	Fragestellung der Arbeit	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Material.....	26
2.1.1	Geräte	26
2.1.2	Reagenzien	27
2.1.3	Antikörper	28
2.1.4	Lösungsrezepte.....	30

2.1.5	Software	35
2.2	Methoden	35
2.2.1	Versuchstiere	35
2.2.2	Probengewinnung (Urin, Blut, Nieren, Nebennieren, Knochen)	36
2.2.3	Metabolische Daten	37
2.2.4	Identifizieren und Separieren der Tubulussegmente	40
2.2.5	SDS-Page und Westernblot	42
2.2.6	Histologische Verfahren	43
2.2.7	Tubulusperfusion	48
2.2.8	Analyse und statistische Auswertung der Daten	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Metabolische Daten	55
3.1.1	Körpermaße	55
3.1.2	Symptome der FHHNC-Erkrankung	56
3.1.3	Salz und Wasserhaushalt	59
3.1.4	Säure-Base-Haushalt	62
3.2	Mikroskopische Morphologie und Expression von Transportproteinen	64
3.2.1	Tubulusemorphologie	64
3.2.2	Subzelluläre Lokalisation und Proteinmenge der Transportproteine	65
3.3	Ex vivo Untersuchungen an isolierten kortikalen Sammelrohren	74
3.3.1	[pH] _i -Verhalten unter extrazellulärer Belastung mit Ammonium	74
3.3.2	Natriumabhängige [pH] _i -Regulation	77
3.3.3	Schaltzell-spezifische [pH] _i -Regulation	78
3.3.4	Elektrische Messungen	79
4	Diskussion	81
4.1	Methodik	81
4.1.1	Metabolische Daten	81
4.1.2	Morphometrie	82

4.1.3	Proteinbiochemie.....	83
4.1.4	Tubulusperfusion.....	84
4.2	Auswirkungen der langfristigen Claudin-16-Defizienz im Mausmodell	84
4.2.1	Nierenfunktion und Elektrolythaushalt in der alternden Maus	84
4.2.2	Das FHHNC-Mausmodell in Alter	85
4.2.3	Calcium- und Magnesium-Haushalt.....	86
4.2.4	Säure-Base-Haushalt	86
4.2.5	Salz- und Wasserhaushalt.....	88
5	Zusammenfassende Betrachtung und Ausblick	92
6	Verzeichnisse.....	94
6.1	Literaturverzeichnis	94
6.2	Abbildungsverzeichnis	107
6.3	Tabellenverzeichnis	108
7	Lebenslauf	109
8	Publikationsliste	111
8.1	Vorträge und Poster	111
9	Erklärung.....	112
10	Danksagung.....	113

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
AE1	Anionenaustauscher 1
APS	Ammoniumpersulfat
AQP	Aquaporin
AUC	Area under the curve
BCECF	2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein
BGA	Blutgasanalyse
BMI	Body-Mass-Index
CA II	Carboanhydrase II
CaSR	Calcium-Sensing-Receptor
cCD	Cortical Collecting Duct
CNT	Connecting Tubule
DCT	Distal Convoluted Tubule
<i>Echem</i>	Chemischer Konzentrationsgradient
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
FE	Fraktionelle Exkretion
FHHNC	Familiäre Hypomagnesiämie mit Hypercalciurie und Nephrocalcinose
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GFR	Glomerulären Filtrationsrate
GM	Glomerulus
vH ⁺ -ATPase	Vacuoläre vH ⁺ -ATPase
IC	Intercalated Cell
KD	Claudin-16 Knockdown Maus
kDa	Kilodalton
NaCl	Natriumchlorid
NCC	Natrium-Chlorid-Cotransporter
NHE	Natrium-Protonen-Antiporter
NKCC2	Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter
NSW	Abstand von Nasenspitze zu Schwanzwurzel
OT	Objektträger
PC	Principal Cell

PFA	Paraformaldehyd
pH _i	Intrazellulärer pH
P Na ⁺	Plasmakonzentration von Natrium
PT	Proximaler Tubulus
R _{te}	Transepithelialer Widerstand
Rpm	Rounds per Minute
siRNA	Small Interfering RNA
TAL	Thick Ascendent Limb
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
U Na ⁺	Urinkonzentration von Natrium
V _{te}	Transepitheliales Potenzial
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Epithelphysiologie

1.1.1 Aufbau und Funktionen von Epithelien

Epithelien sind Zellverbände, die die inneren und äußeren Körperoberflächen auskleiden und eine Vielzahl von Funktionen wahrnehmen.

Die Epithelzellen sind polar aufgebaut und lassen sich jeweils in ein apikales (bzw. lumenales) und ein basolaterales (der Basalmembran zugewandtes) Kompartiment einteilen. Sie haben Barriere- und Schutzfunktionen [60] und sind in der Lage, chemische und elektrische Gradienten aufzubauen [51]. Grundlage dieser Barrierefunktion ist der sogenannte Haftkomplex, bestehend aus den Desmosomen, der *Zonula adhaerens* und der *Zonula occludens* (*tight junction*) [80].

Mit Hilfe der chemischen und elektrischen Gradienten sind Epithelien in der Lage, durch Sekretion und Absorption gezielt Stofftransport zu gewährleisten (siehe Abb. 1).

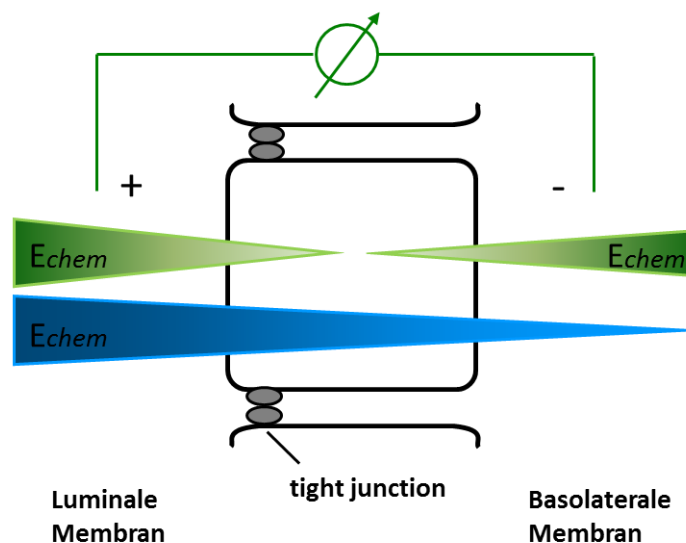


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Epithels

Dargestellt ist der polare Aufbau mit luminaler und basolateraler Membran und der Verschlusskontakt (*tight junction*). Als Pfeile sind chemische Konzentrationsgradienten (E_{chem}) von extra- nach intrazellulär (grün) bzw. von luminal nach basolateral (blau) dargestellt. Das Spannungsmessgerät oben zeigt Triebkräfte an, die sich als transepitheliale Spannung messen lassen.

1.1.2 Das Membranpotenzial

Aufgrund des polaren Aufbaus sind die Zellen in der Lage, über die Membran Konzentrationsgradienten für geladene Ionen aufzubauen und somit die Membran elektrisch zu polarisieren. Der Motor dieses Prozesses ist die basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase, die hohe chemische Gradienten für Natrium und Kalium generiert. Aufgrund der selektiven Permeabilität der Membran für bestimmte Ionen (z.B. K^+) in Form von Ionenkanälen, entsteht beim Versuch des Ions, die Zelle durch diesen Kanal zu verlassen, eine elektrische Spannung über die Membran, die der chemischen Triebkraft in der gleichen Größe entgegengerichtet ist. Es kommt somit zu keinem Nettofluss über die Membran und es stellt sich das sogenannte Gleichgewichts- oder Nernst-Potenzial ein, das sich für jedes Ion mit der folgenden Formel berechnen lässt [51]:

$$E = \frac{61,54 \text{ mV}}{Z_e} \lg \frac{c(\text{innen})}{c(\text{außen})}$$

Abbildung 2: Nernst-Gleichung

Das Gleichgewichtspotenzial E für einen Ionengradienten über eine selektiv permeable Membran wird aus dem Logarithmus der Konzentrationen c dieses Ions innerhalb und außerhalb der Zelle, der Wertigkeit Z_e des Ions und der Konstante $-61,54 \text{ mV}$ (Ladung des Ions, absolute Temperatur, allgemeine Gaskonstante, Faradaykonstante, $\ln 10$) berechnet.

Aufgrund der dominanten Kaliumleitfähigkeit der meisten Zellen, ergibt sich im Ruhezustand zunächst ein Membranpotenzial von ca. -90 mV , was dem Gleichgewichtspotenzial von Kalium entspricht. Werden Leitfähigkeiten für andere Ionen (z.B. Na^+) zusätzlich in die Zellmembran eingebaut, ändert sich das Membranpotenzial und berechnet sich dann anteilig aus den verschiedenen Gleichgewichtspotenzialen. Epithelzellen weisen die Besonderheit auf, dass ihre luminale und basolaterale Membran elektrisch voneinander isoliert sind, sowie einen unterschiedlichen Besatz an Transportproteinen und Kanälen aufweisen. Da diese Membranen somit unterschiedliche Potenziale aufweisen können, kann so insgesamt ein transepitheliales Potenzial generiert werden.

1.1.3 Transportmechanismen

Wesentliche Triebkräfte für den epithelialen Transport sind chemische (z.B. unterschiedliche Ionenkonzentrationen luminal/basolateral) oder elektrische Gradienten (Membranpotenzial, transepitheliales Potenzial).

Des Weiteren ist es von großer Bedeutung, ob der Transport *durch* die Zelle (transzellulär) oder durch den Spalt *zwischen* den einzelnen Zellen (parazellulär) stattfindet.

Für den transzellulären Transportweg lassen sich dabei verschiedene Transportprozesse abgrenzen (siehe Abb. 3):

- Kanalvermittelte Diffusion entlang eines Gradienten, zum Beispiel durch den epithelialen Natriumkanal (ENaC)
- Primär aktiver Transport entgegen eines Gradienten unter Energieverbrauch (ATP), zum Beispiel durch die vacuoläre H^+ -ATPase
- Sekundär aktiver Transport, bei dem ein Ion entlang eines Gradienten transportiert wird und unter Ausnutzung der potenziellen Energie weitere Teilchen entgegen eines Gradienten transportiert wird, zum Beispiel durch den Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter (NKCC2)

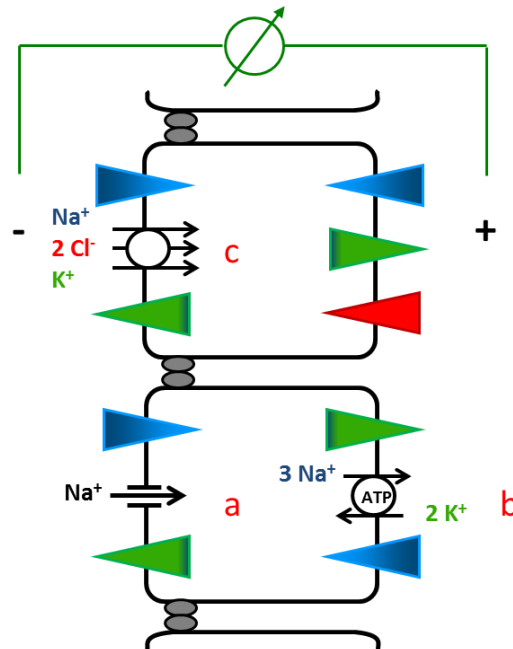


Abbildung 3: Transzellulärer Transport

Beispielhaft sind dargestellt: Erleichterte Diffusion für Natriumionen entlang eines Konzentrationsgradienten über einen Kanal (a), primär aktiver Antiport von Natrium und Kalium entgegen ihrer Konzentrationsgradienten unter ATP-Verbrauch (b) und sekundär aktiver Transport von Natriumionen entlang ihres Gradienten, sodass Kalium- und Chloridionen entgegen ihres Gradienten transportiert werden können (c). Die farbigen Dreiecke versinnbildlichen die Konzentrationsgradienten der jeweiligen Ionen.

Der parazelluläre Transport findet über die interzellulär gelegenen *tight junctions* statt, die in ihrer Dichtigkeit sehr variabel sind [80]. Integrale Bestandteile der *tight junction* sind Claudine, die in der Lage sind, eine ladungsselektive Ionenpore auszubilden [47, 80, 106]. Für diesen Transportweg gelten dieselben elektrochemischen Triebkräfte wie für den transzellulären. Ein Beispiel für diesen Transportprozeß ist die parazelluläre Absorption von Magnesium- und Calciumionen in der dicken aufsteigenden Henle Schleife [33, 41, 44].

1.1.4 Claudine

Bei den Claudinen handelt es sich um eine heterogene Familie von 22-24 kDa großen Transmembranproteinen, wobei sowohl gleiche Claudin-Subtypen als Homomer miteinander interagieren, um den Verschlusskontakt auszubilden oder aber auch verschiedene als Heteromer [41]. Durch diese Varianz in der Zusammensetzung sind die Claudine für die spezifische Permeabilität des parazellulären Weges verantwortlich (siehe Abb. 4). So konnte an MDCK-Zelllinien gezeigt werden, dass die gebildeten Poren ladungs- und größenselektiv sind [32, 47, 80, 106].

Claudin-Subtypen haben eine differenzierte Verteilung zwischen verschiedenen Organen: So sind die für uns relevanten Claudine 16 (früher Paracellin 1) und 19 fast ausschließlich in der TAL der Niere beheimatet [22, 42], wobei einige Studien jedoch auch eine Expression vor allem von Claudin 19 im DCT und CD nachweisen konnten [98].

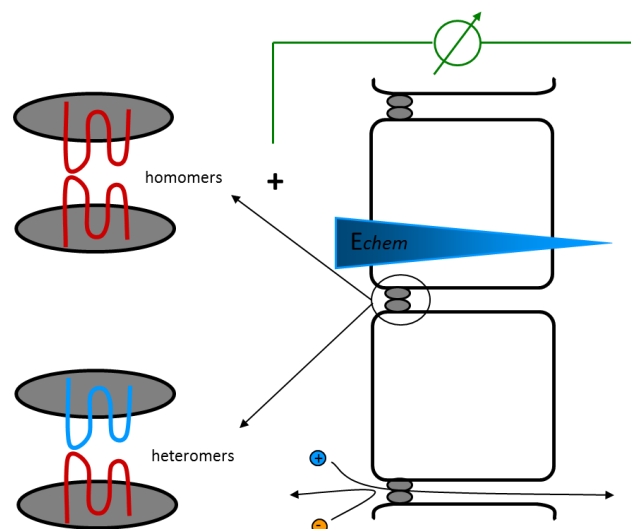


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Epithels

Dargestellt ist der polare Aufbau mit luminaler und basolateraler Membran und der Verschlusskontakt (*tight junction*, grau). *Tight junctions* bestehen u.a. aus Claudinen, die cis- und transseitig als Homo- und Heteromere auftreten. Der chemische Konzentrationsgradient (*Echem*) von luminal nach basolateral ist blau dargestellt. Das Spannungsmessgerät oben steht für elektrische Triebkräfte, die sich als transepitheliale Spannung messen lassen. In dem hier gezeigten Fall erlauben beide Triebkräfte zusammen mit der Selektivität der *tight junction* einen Kationenfluss von luminal nach basolateral.

1.2 Nierenphysiologie

1.2.1 Histologische Gliederung

Die Niere nimmt eine zentrale Rolle als Stoffwechselorgan ein, da sie außer als Ausscheidungsorgan für wasserlösliche Stoffwechselprodukte auch maßgeblich an der Regulation des Elektrolyt- und Wasser- sowie des Säure-Base-Haushaltes beteiligt ist [60].

Die Funktionseinheit der Niere ist das Nephron, das aus dem Glomerulus und den sich anschließenden verschiedenen Segmenten des Nierentubulus besteht (siehe Abb. 5).

Der proximale Tubulus steht ganz im Dienste der Rückgewinnung des Großteils der im Glomerulus filtrierte Elektrolyte und Wassers. Über sekundär aktiven Transport wird Natrium in Kombination mit Glukose, Aminosäuren, Phosphat oder Protonen transzellulär resorbiert. Dadurch wird ein kleiner, jedoch effektiver osmotischer Gradient über das Epithel aufgebaut, der für einen parazellulären Massentransport von Wasser und Elektrolyten genutzt wird, der als „solvent drag“ bezeichnet wird [51, 57]. Da dieser Abschnitt des Tubulus, genauso wie der dünne Anteil der Henle Schleife, für unsere Untersuchungen nur eine untergeordnete Rolle spielt, soll an dieser Stelle nicht weiter auf die einzelnen Transporter und Prozesse eingegangen werden.

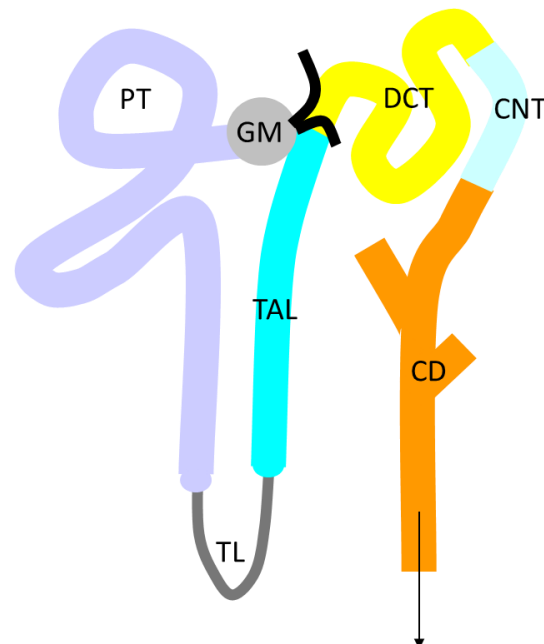


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Nephrons:

An den Glomerulus (GM) schließt sich der proximale Tubulus (proximal tubule - PT) an, der sich im Nierenmark zur dünnen Henle'schen Schleife (thin loop - TL) verjüngt. Dem dicken, aufsteigenden Teil (thick ascending limb - TAL) folgen das distale Konvolut (distal convoluted tubule - DCT) und der Verbindungstubulus (connecting tubule - CNT), über den jeweils mehrere Nephrene in ein Sammelrohr (collecting duct - CD) münden.

1.2.2 Dicker aufsteigender Teil der Henle Schleife

Für uns von besonderem Interesse war der dicke Anteil des aufsteigenden Schenkels der Henle Schleife (*thick ascending limb* – TAL, siehe Abb. 5). In der TAL erfolgt ein aktiver Transport von NaCl aus dem Lumen in das Interstitium. Da der aufsteigende Teil der Henle Schleife im Gegensatz zum absteigenden wasserundurchlässig ist, wird aufgrund der NaCl-Transportleistung und dem im Mark der Niere genutzten Gegenstromprinzip in diesem ein papillenwärts zunehmender osmotischer Gradient aufgebaut [51], der unter anderem als treibende Kraft für die Wasseraufnahme im Sammelrohr genutzt werden kann. Gleichzeitig sinkt die luminal Osmolalität entlang dieses Nephronabschnittes, weswegen die TAL auch als Verdünnungssegment bezeichnet wird. Die Haupttransportmechanismen in der TAL sollen anhand der Abb. 6 verdeutlicht werden.

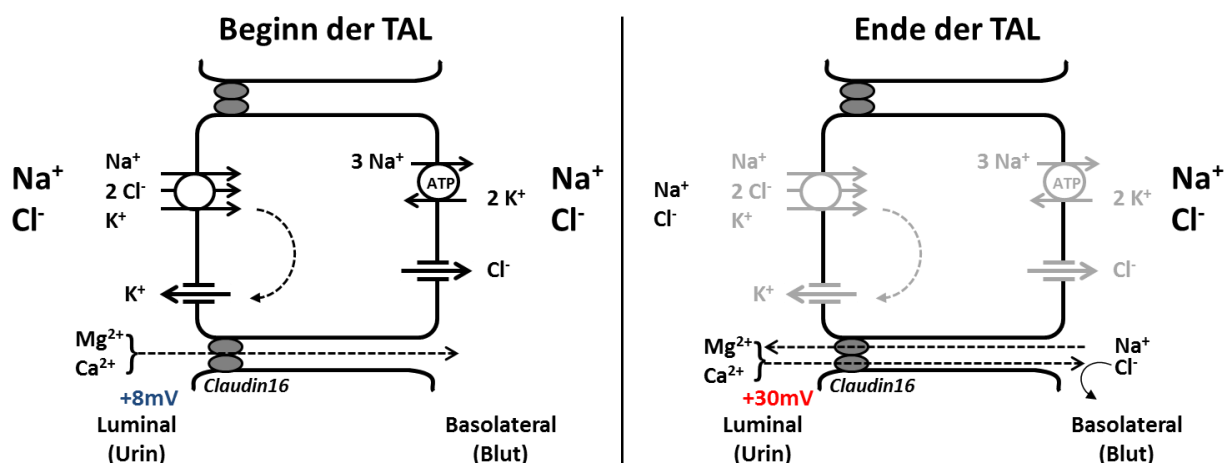


Abbildung 6: Transportsysteme der TAL

Die kontinuierliche sekundär-aktive Resorption von NaCl führt zu Beginn der TAL zu einem Lumenpositiven Potenzial von +8 mV. Gegen Ende der TAL herrscht dagegen ein hohes Diffusionspotential von bis zu +30 mV. In beiden Fällen wird das lumenpositive Potenzial zur Resorption der divalenten Kationen Mg²⁺ und Ca²⁺ genutzt.

Der aktive Transport von Natrium und Chlorid geschieht in der TAL durch den in der luminalen Membran befindlichen Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporters (NKCC2 oder BSC1) [29, 57]. Triebkraft hierfür ist die basolaterale Na⁺/K⁺-ATPase. Während nun das Kalium über den luminalen Kaliumkanal (ROMK) rezirkulieren kann [13], ist das Chlorid in der Lage, die Zelle über basolaterale Chloridkanäle vom Typ CLC-Kb zu verlassen [88]. Das K⁺-Recycling zusammen mit der basolateralen Chlorid-Leitfähigkeit hyperpolarisiert die luminalen Membran und schafft somit ein lumenpositives Potenzial [51] von zunächst ca. +8

mV. Dieses Potenzial ermöglicht parazellulär die Absorption von Kationen, da die tight junctions in der TAL sehr kationenpermeabel sind. So wird für jedes transzellulär transportierte Natriumion ebenfalls eines über den parazellulären Weg aufgenommen [36, 83]. Entlang der TAL sinkt die luminale NaCl-Konzentration ab, sodass letztlich der transzelluläre Transport wegen der sich selbst reduzierenden Triebkräfte sogar zum Erliegen kommen kann. Aufgrund der hohen Kationenselektivität und des Konzentrationsgradienten kommt es dafür zur Ausbildung eines transepithelialen Gleichgewichtspotenziales, da Na^+ parazellulär zurück ins Lumen strömen kann, bis sich elektrische und chemische Triebkräfte wieder ausgleichen [31, 83]. Dieses Potenzial von bis zu ca. +30 mV stellt nun die Triebkraft für die parazelluläre Absorption anderer Kationen wie Magnesium und Calcium dar. Sie werden über diesen Mechanismus im Austausch gegen äquivalente Mengen Natriumionen aufgenommen. Insgesamt werden in der TAL ca. 30% des Calciums und sogar ca. 70% des glomerulär filtrierten Magnesiums aufgenommen [51].

1.2.3 Distales Konvolut

Im distalen Konvolut (*distal convoluted tubule* - DCT) wird vornehmlich NaCl über den elektroneutralen Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC) resorbiert [8, 57]. Hier befinden sich allerdings auch Kanäle, die für die Feinregulation der Aufnahme von Calcium und Magnesium zuständig sind. Für das Calcium wird hier in der luminalen Membran der Calcium-Kanal TRPV5 exprimiert, für das Magnesium der TRPM6-Kanal [12, 20, 66, 104], die beide unter hormoneller Kontrolle stehen [30, 102]. Calcium wird über einen basalen Natrium-Calcium-Antiporter sowie eine Calcium-ATPase aus der Zelle transportiert [12], für den basolateralen Magnesiumtransport werden äquivalente Mechanismen angenommen [20]. Die basale Rezirkulation des Kaliums erfolgt über Kaliumkanäle des Typs Kir 4.1, die vom KCNJ10-Gen kodiert werden [10, 56] (siehe Abb. 7).

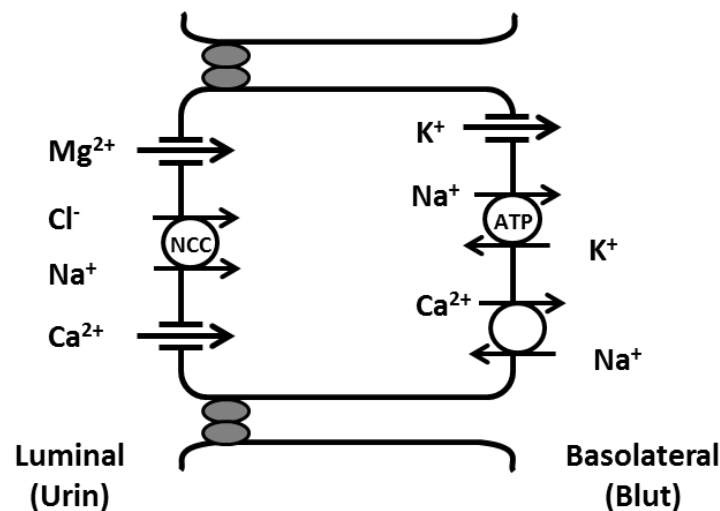


Abbildung 7: Transportsysteme des DCT

Auf der luminalen Seite werden der Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC), der Calciumkanal TRPV5 und der Magnesiumkanal TRPM6 exprimiert. Die resorbierten Calciumionen werden durch basolaterale Natrium-Calcium-Antiporter sowie Calcium-ATPasen (hier nicht eingezeichnet) ins Interstitium transportiert. Die Triebkraft für den hier stattfindenden energieaufwändigen transzellulären Natrium/Chlorid-Transport liefert die basolaterale Na⁺/K⁺-ATPase. Die Kaliumionen rezirkulieren über Kir4.1 Kaliumkanäle. Der basolaterale Mechanismen des Magnesiumtransportes sind nicht eingezeichnet.

1.2.4 Sammelrohr

Das Sammelrohr stellt die Endstrecke des Tubulus dar: Mehrere Verbindungstubuli (*connecting tubule* - CNT) enden in ein gemeinsames Sammelrohr, welches von dem Nierencortex bis hinunter ins Mark zieht. Hier kommen mehrere Zelltypen vor, die Hauptzellen (*principal cells* - PC) und verschiedene Typen von Schaltzellen (*intercalated cells* - IC) [60].

Es ist sinnvoll, zwischen kortikalem und medullärem Anteil des Sammelrohres zu differenzieren, da sich der Zellbesatz von proximal nach distal verändert.

In den Hauptzellen befinden sich zwei wesentliche Transportsysteme (siehe Abb. 8): Zum einen der epitheliale Natriumkanal (ENaC) zum anderen das Aquaporin 2 (AQP2). Beide spielen bei der Volumenregulation und Harnkonzentrierung eine maßgebende Rolle und stehen unter starker hormoneller Kontrolle. Eine luminal Kaliumpermeabilität (Kanäle) verbindet die Natriumresorption mit Kaliumsekretion und liefert die Triebkraft für den Natriumeinstrom durch Hyperpolarisation der luminalen Membran.

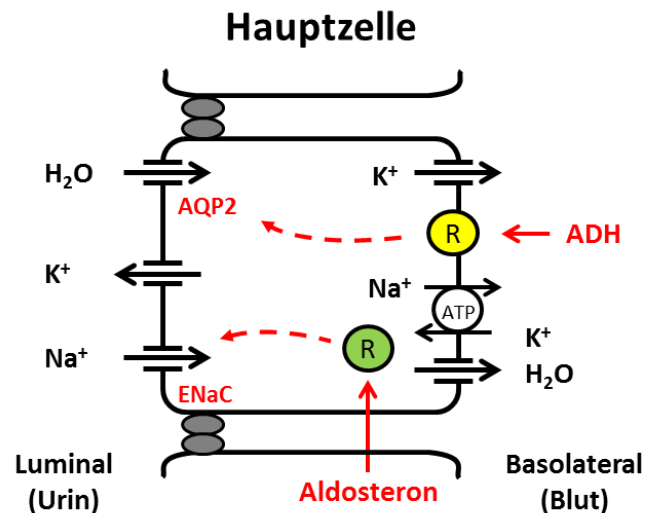


Abbildung 8: Transportsysteme der Hauptzelle des Sammelrohres

Die Hauptzellen besitzen luminal zum einen den epithelialen Natriumkanal ENaC, dessen Membraneinbau u.a. über den zytoplasmatischen Aldosteronrezeptor reguliert wird, zum anderen das Aquaporin AQP2, dessen Membraneinbau über den membranständigen ADH-Rezeptor gesteuert wird. Basolateral findet sich die Na^+/K^+ -ATPase sowie AQP3, über das das resorbierte Wasser die Zelle verlassen kann.

Über die Schaltzellen des Sammelrohres findet in wesentlichem Maße die pH-Regulation des Urins statt. Bei den Schaltzellen gibt es 3 Spezies: Die A-Typ-, die B-Typ- und die Non-A-non-B-Schaltzellen [92, 94]:

Die A-Typ-Schaltzelle (siehe Abb. 9) dient der Säuresekretion, sie exprimiert luminal die vacuolare H^+ -ATPase (vH^+ -ATPase), die aktiv Protonen sezerniert [89, 93]. Diese werden von der im Zytoplasma lokalisierten Carboanhydrase II (CA II) bereitgestellt, die die Reaktion der Kohlensäure zu Proton und Bicarbonat (HCO_3^-) katalysiert [6, 68]. Das anfallende Bicarbonat wird basolateral im Austausch gegen Chlorid durch den Anionentauscher 1 (AE1) ins Interstitium abgegeben, wobei das Chlorid durch einen Kanal rezirkulieren kann [93]. Die von den A-Typ-Schaltzellen sezernierten Protonen binden den Ammoniak als Ammoniumionen im Lumen.

In den B-Typ-Schaltzellen (siehe Abb. 9) sind die Transportproteine im Vergleich invertiert. Diese Zellen sezernieren luminal Bicarbonat im Austausch gegen Chlorid über den Anionentauscher Pendrin (PDS) [23, 93]. Auch hier ist im Zytoplasma wieder die Carboanhydrase II lokalisiert. Die vH^+ -ATPase ist in diesen Zellen in der basolateralen Membran zu finden, die dort die anfallenden Protonen ins Interstitium abgibt. Auch hier kann das Chlorid durch basolaterale Kanäle aus der Zelle entweichen. Es wird aktuell diskutiert, inwieweit der Anionentauscher Pendrin über die Chlorigaufnahme zur Blutdruck- und Volumenregulation beiträgt [9, 35, 91, 93, 95].

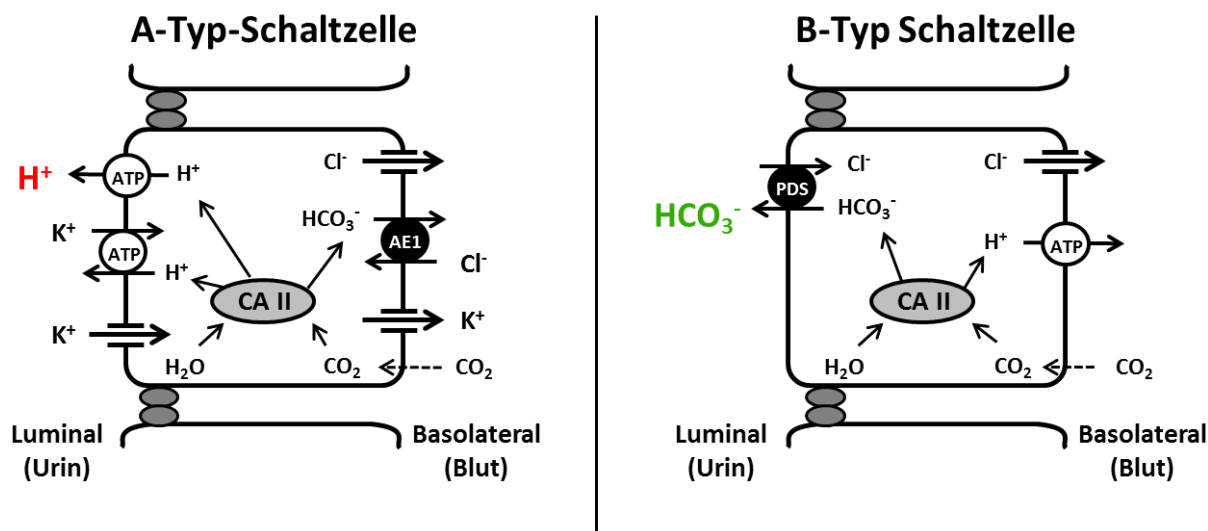


Abbildung 9: Transportsysteme der Typ-A/B-Schaltzellen des Sammelrohres

A-Typ Schaltzellen sezernieren luminal aktiv Protonen durch die vH^+ -ATPase und H^+/K^+ -ATPase. Das in der Carboanhydrase Typ II (CA II)-Reaktion entstandene Bicarbonat wird über den basolateralen Anionenaustauscher I (AE1) an das Blut abgegeben.

Entgegengesetzt sezernieren Schaltzellen Typ B (rechts) über Pendrin (PDS) luminal passiv Hydrogencarbonat und pumpen aktiv das aus der CA II-Reaktion entstandene Proton auf die Blutseite.

Bei dem dritten Zelltypus handelt es sich um die Non-A-Non-B-intercalated cells (siehe Abb. 10), deren Funktion noch nicht vollständig verstanden ist und deren Ausstattung mit Transportproteinen in der Literatur noch Gegenstand der Diskussion ist. Bisher konnte apikal die vH^+ -ATPase sowohl membranär als auch vacuolär nachgewiesen werden [18, 50, 61, 68, 94]. Zusätzlich findet sich in der luminalen Membran auch der Anionentauscher Pendrin [61, 94, 100]. Der basolaterale Transporterbesatz ist noch weitgehend unbekannt. Von einigen Arbeitsgruppen konnte ein Anionentauscher nachgewiesen werden [22], hierbei handelt es sich allerdings nicht um den AE1 [18, 50, 94]. Nach gängiger Meinung trägt dieser Zelltyp zur Sekretion von Protonen ins Lumen bei [68, 94]. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Non-A-Non-B-intercalated cells eine hohe Prävalenz im CNT und im initialen CD haben [68, 94].

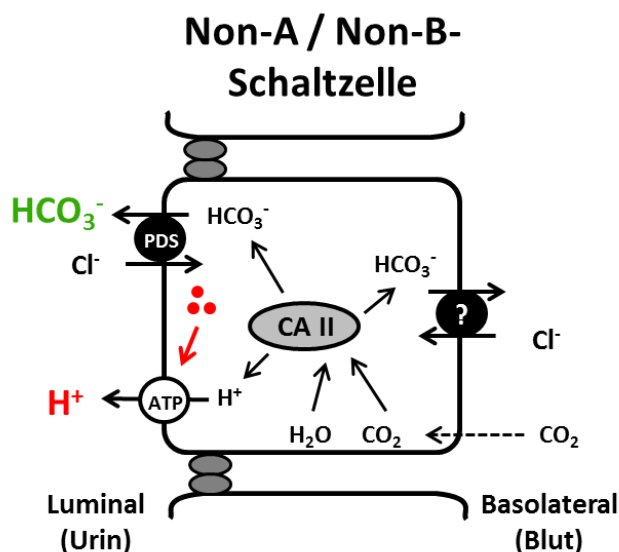


Abbildung 10: Transportsysteme der Non-A-Non-B-Schaltzelle im Sammelrohr

Für die Non-A-Non-B-Schaltzelle konnte bisher eine luminal Ausstattung sowohl mit Pendrin als auch der vH^+ -ATPase nachgewiesen werden. Zusätzlich finden sich im subapikalen Bereich zahlreiche Vesikel mit vH^+ -ATPase. Basolateral wird ebenfalls ein Anionenaustauscher postuliert, hierbei handelt es sich allerdings nicht um den AE1.

1.3 Die Claudin-16 Knockdown Maus

1.3.1 Unterdrückung der Claudin-16 Expression

In dem von uns benutzten Mausmodell ist die Claudin-16-Expression durch genetische Manipulation stark herunterreguliert. Hierzu wurde das sogenannte *gene-silencing* angewandt, wobei mit Hilfe von Lentiviren *small interfering RNA* (siRNA) in die Erbinformation integriert wird, die die Expression von Claudin-16 auf translationeller Ebene hemmt [45].

Durch den Verlust von Claudin-16 verringert sich in der TAL die Kationenselektivität der *tight junctions*. So sinkt das Permeabilitätsverhältnis von Natrium zu Chlorid ($P(Na^+/Cl^-)$) von einem Normalwert von 2-4 um mehr als die Hälfte [31, 38, 45, 101]. Dies hat in der späten TAL einen parazellulären Rückstrom zur Folge, bei dem NaCl entsprechend seinem Konzentrationsgradienten vom Interstitium ins Lumen strömt. Dadurch kommt es zu einem Zusammenbruch des lumenpositiven Potenzials von ehemals ca. +30 mV auf nunmehr nur noch ca. +2 mV [38, 41, 45, 58]. Hiermit entfällt die wesentliche Triebkraft für die Resorption von Magnesium und Calcium, was zu einer deutlich erhöhten Urinausscheidung dieser Ionen führt [38, 101]. Aufgrund dieses Defektes ist also die Nettoresorption von NaCl ebenfalls vermindert, sodass der distale Tubulus vermehrt mit diesem Ionen belastet wird [38, 45].

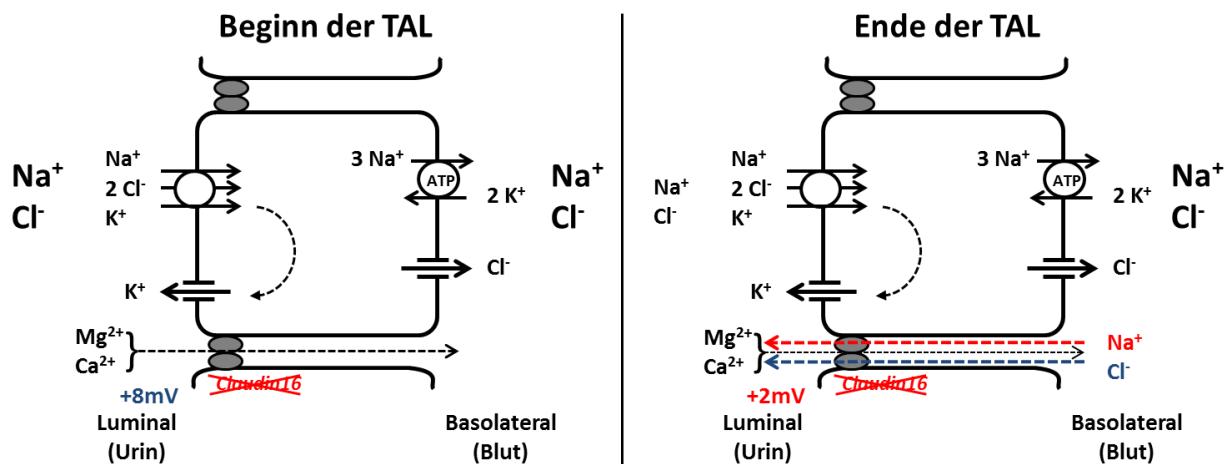


Abbildung 11: Schematische Darstellung der funktionellen Auswirkungen des Knockdowns von Claudin-16 in der TAL (vgl. Abb. 6)

Diese Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Transportprozesse in der TAL der Claudin-16 Knockdown Maus (KD). Im linken Teil sind die Transportprozesse im frühen Anteil dargestellt. Die transepitheliale Transportleistung ist nicht eingeschränkt und es kann ein lumenpositives transepitheliales Potenzial von ca. +8 mV generiert werden, analog zur Situation in den WT. Im späten Teil der TAL ist das Diffusionspotential durch verminderte Selektivität für Natrium reduziert. NaCl strömt zurück ins Lumen und Mg^{2+} und Ca^{2+} werden vermindert resorbiert.

Nach kontinuierlicher, sekundär-aktiver NaCl-Resorption entlang der TAL sinkt die luminal im Vergleich zur basolateralen NaCl-Konzentration ab (Siehe Abb. 11, rechter Teil). Da die *tight junction* der KD in der TAL nicht mehr allein Kationen-selektiv ist, können Na^+ und Cl^- entlang ihres Konzentrationsgradienten vom basolateralen in das lumenale Kompartiment zurückdiffundieren. Dieses bewirkt einen Zusammenbruch des transepithelialen Potenzials (V_{te}) auf etwa +2 mV. Hierbei handelt es sich um einen funktionellen Kurzschluss, in dessen Konsequenz die transepitheliale Triebkraft für die Resorption von Mg^{2+} und Ca^{2+} verloren geht.

1.3.2 FHHNC, der Bezug zur Klinik

Der Knockdown von Claudin-16 stellt ein Mausmodell für die Krankheit familiäre Hypomagnesiämie mit Hypercalciurie und Nephrocalcinose (FHHNC) dar. Dabei handelt es sich um eine sehr seltene, autosomal rezessiv vererbte, schwere Nierenerkrankung des Menschen. Für diese Erbkrankheit konnte eine starke Assoziation mit Mutationen im Claudin-16- und im Claudin-19-Gen gezeigt werden [41, 53, 54, 58, 99]. Aufgrund der geringen Prävalenz und der Breite der Mutationen ist der Phänotyp bei erkrankten Personen sehr individuell. Allen gemeinsam ist jedoch der renale Verlust an Calcium und Magnesium, der zur Hypomagnesiämie, beidseitiger Verkalkung des Nierenparenchyms (Nephrocalcinose)

sowie deutlicher Neigung zur Ausbildung von Nierensteinen führt. Außerdem ließen sich Symptome wie Konvulsionen, Polydipsie, Polyurie, Karpopedalspasmen, Rachitis und wiederkehrende Infektionen des Urogenitaltraktes nachweisen [11, 54, 72, 99]. Eine Subgruppe an Erkrankten zeigte zusätzlich eine Reihe von okulären Auffälligkeiten [53, 58], welche auf den Defekt von Claudin-19 zurückzuführen ist, das außer in der TAL auch dort vorkommt [54]. Der Erkrankungsbeginn der FHHNC liegt bereits im frühen Kindesalter und bei den meisten Patienten zeigt sich innerhalb weniger Jahre eine rapide Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) [11, 54, 72]. Kritisch für die Prognose dieser Erkrankung ist die Nephrocalcinose, die im Krankheitsverlauf zur terminalen Niereninsuffizienz führt, was für die Patienten Dialyse- oder Transplantationspflichtigkeit bedeutet [53].

1.4 Hormone und Regulationsmechanismen

1.4.1 Elektrolyt- und Wasserhaushalt

Die Niere nimmt eine zentrale Funktion im Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt ein und wird dabei eng hormonell kontrolliert: Im juxtaglomerulären Apparat, einer Schnittstelle zwischen *Vas afferens* und distalem Tubulus, wird der Salzgehalt des Urins gemessen [19, 60]. Über den tubuloglomerulären Feedback Mechanismus wird die GFR des einzelnen Nephrons der tubulären Transportfähigkeit angepasst. Bei Abfall des Blutdrucks, der GFR oder der Salzkonzentration des Urins sowie bei sympathischer Aktivierung wird außerdem das Enzym Renin ausgeschüttet, das in einer proteolytischen Kaskade (siehe Abb. 12) zur Bildung von Angiotensin II führt [19, 51]. Dieses bewirkt über den Angiotensin II-Rezeptor (AT1) eine Vasokonstriktion, das Auftreten von Durst und Salzappetit, eine vermehrte NaCl-Absorption im PT [59, 81], sowie eine erhöhte AQP2-Aktivität im CD [86]. Des Weiteren wird durch Angiotensin II die Freisetzung des Mineralokortikoids Aldosteron aus der *Zona glomerulosa* der Nebenniere stimuliert. Aldosteron bewirkt in der Niere über zytoplasmatische Rezeptoren eine vermehrte Produktion und Membraneinbau des ENaC in den Hauptzellen des CD mit dem Effekt einer erhöhten Natriumabsorption und Kaliumsekretion. Zusätzlich wird im distalen Nephron die H⁺- und NH₄⁺-Ausscheidung erhöht [8, 16, 21, 51, 57].

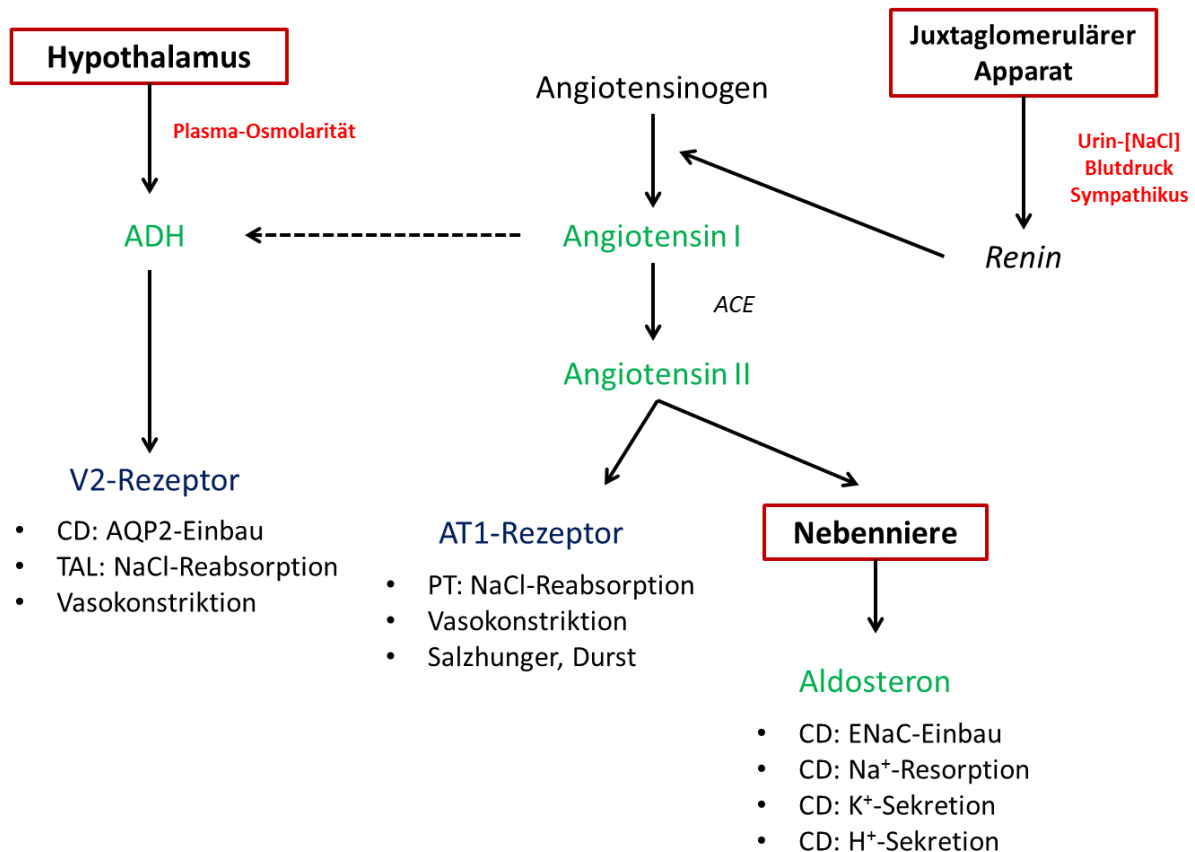


Abbildung 12: Schematische Übersicht über die Steuerhormone des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes und ihre Wirkungen

Die Ausschüttung von Renin löst eine proteolytische Kaskade aus: Renin spaltet Angiotensinogen zu Angiotensin I, das durch das angiotensin-converting-enzyme (ACE) zu Angiotensin II umgewandelt wird. Angiotensin I führt ebenfalls zu einer ADH-Ausschüttung aus der Hypophyse.

Ein weiteres wichtiges Steuerungshormon ist das Antidiuretische Hormon (ADH, auch Vasopressin genannt), das aus dem Hypophysenhinterlappen ausgeschüttet wird, wenn die Osmorezeptoren des Hypothalamus einen Anstieg der Plasmaosmolarität messen. ADH bewirkt über den Vasopressinrezeptor (V2-Rezeptor) eine Vasokonstriktion, eine vermehrte NaCl-Reabsorption in der TAL (vermehrter NKCC2-Einbau) [49], sowie den luminalen Einbau von zusätzlichen AQP2-Proteinen in das Sammelrohr, was zu einer Steigerung der Wasserresorption führt [51]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass ADH auch die ENaC-Expression erhöht [16, 21, 57].

1.4.2 Die Niere und der Calcium- und Magnesiumhaushalt

Calcium muss als universeller *second messenger* und wichtiges Ion in der Zellerregbarkeit in der Extrazellulärflüssigkeit und im Plasma in engen Grenzen reguliert werden. Des Weiteren ist es essentiell für den Knochenstoffwechsel, wo es zusammen mit Phosphat als

Hydroxylapatit die Knochenmatrix bildet. Die Regulation dieser beiden Ionen ist daher stark gekoppelt und steht unter der Kontrolle der Hormone Parathormon, Calcitriol (Vitamin D3) und Calcitonin (siehe Abb. 13). Das aus den Nebenschilddrüsen stammende Parathormon wird bei sinkendem Plasmacalciumspiegel mittels des *calcium-sensing-receptors* ausgeschüttet und führt zu einer gesteigerten Mobilisierung von Calcium und Phosphat aus den Knochen durch vermehrten Abbau. Gleichzeitig wird im PT die Phosphatresorption vermindert und die Calciumabsorption in der Henle Schleife und im distalen Tubulus erhöht [12, 51]. Im DCT geschieht dies durch die Aktivierung von TRPV5-Kanälen [30, 39] sowie der Ca^{2+} -ATPase und des Natrium-Calcium-Antiporters [12]. Die Ausschüttung von Parathormon steigert auch die Synthese von Calcitriol, dieses erhöht die gastrointestinale Aufnahme von Calcium über den TRPV6-Kanal [46], sowie die renale Calciumresorption, ebenfalls über TRPV5 [40]. Des Weiteren wird durch Calcitriol im Knochen die Mineralisation durch Hemmung der Osteoklasten und Stimulation der Osteoblasten gefördert [51]. Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse ist am ehesten als Gegenspieler des Parathormons zu sehen. Es vermindert die intestinale Calciumaufnahme, stärkt ebenfalls die Knochenmineralisation und erhöht den renalen Calciumverlust. Allerdings bewirkt es ebenfalls eine Phosphaturie [37].

Ein weiterer wichtiger Regulator des Phosphat- und Vitamin D-Haushaltes ist der von Osteoblasten sezernierte Fibroblasten-Wachstumsfaktoren-23 (FGF-23). Dieser erhöht die renale Phosphatausscheidung und vermindert die Calcitriol-Sekretion um eine konstante Plasma-Phosphatkonzentration aufrechtzuerhalten [75].

Die Aufnahme von Magnesiumionen im distalen Tubulus wird gleichsinnig der Calciumabsorption durch Parathormon, Calcitonin und Calcitriol gefördert [20]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Hormonwirkung durch Aldosteron potenziert wird [20]. Allerdings sind hier die ultrastrukturellen Effektormoleküle deutlich weniger gut erforscht als beim Calciumtransport.

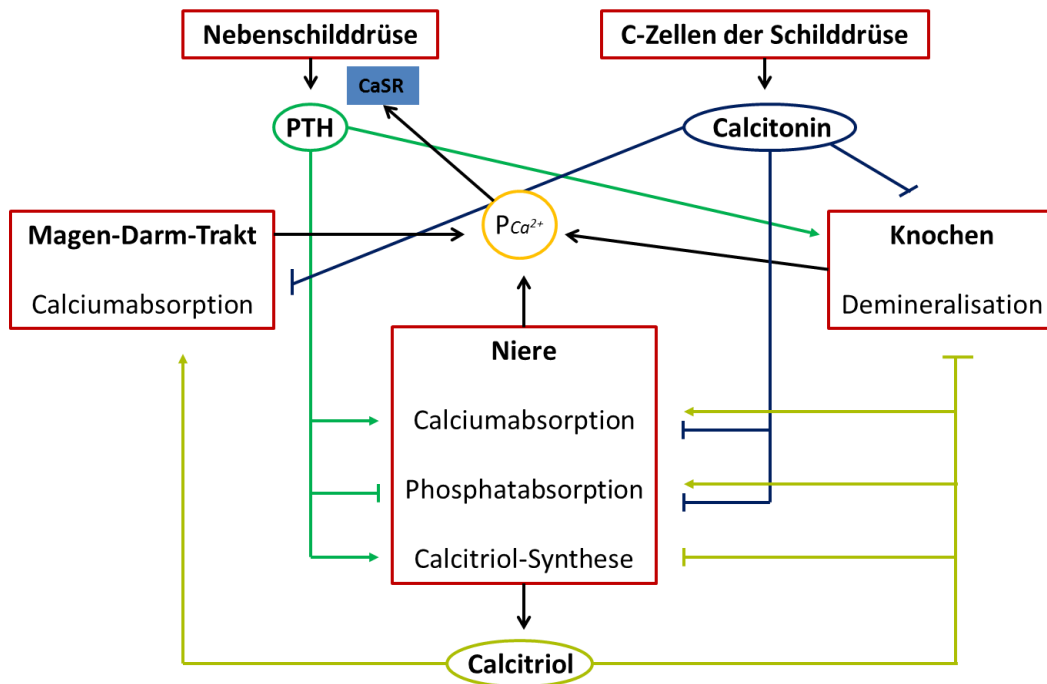


Abbildung 13: Regulation des Calciumhaushaltes

Schematische Übersicht über die Auswirkungen (spitzer Pfeil = Steigerung, stumpfer Pfeil = Inhibition) der drei zentralen Steuerhormone auf Niere, Knochen und Magen-Darm-Trakt. Der calcium-sensing-receptor wurde mit CaSR abgekürzt.

1.5 Renaler Ammoniak-Haushalt

Für den Organismus ist es essentiell, im Aminosäurestoffwechsel anfallenden Ammoniak als Ammonium renal auszuschleiden. So wird im PT basolateral Glutamin aufgenommen, aus dem dann enzymatisch Ammoniak abgespalten werden kann. Die Protonen werden dann hauptsächlich über den Natrium-Protonen-Antiporter NHE3 ins Lumen sekretiert [93]. In der TAL wird Ammonium dann zum einen aktiv über den NKCC2 anstelle von Kalium aufgenommen, zum anderen wird spekuliert, dass auch ein Transport über luminale Kaliumkanäle stattfindet sowie passiv über den parazellulären Weg, wobei auch hier das lumenpositive Potenzial die Triebkraft darstellt [27]. Das Ammonium wird dann basolateral ins medulläre Interstitium abgegeben, um von den Zellen des äußeren medullären Sammelrohres sekretiert zu werden [93]. Die basolaterale Aufnahme des Ammoniums in diese Zellen ist momentan noch Gegenstand der Forschung, wobei mehrere potenzielle Wege beschrieben wurden. So konnte eine Aufnahme von Ammonium über den NKCC1 und die Na^+/K^+ -ATPase nachgewiesen werden [48, 87, 93]. Einige Arbeitsgruppen propagieren sogar die Existenz eines K^+/NH_4^+ -Antiporters [6]. Das aufgenommene Ammonium wird dann zu Ammoniak deprotoniert, der dann über die luminale Membran diffundieren kann, wobei dieser Mechanismus durch die Rhesusproteine RhBG und RhCG erleichtert wird, die als Pore

für ungeladene Gase dienen [93]. Es steht ebenfalls zur Debatte, ob die Rhesusproteine beim basolateralen Transport ebenfalls involviert sind [4]. Im Lumen wird der Ammoniak durch die von den A-Typ-Schaltzellen sezernierten Protonen „gefangen“ (sogenanntes Ammoniak-trapping) [48]. Diese Aufgabe der Schaltzellen scheint der wesentliche Faktor zur Sekretion des Ammoniaks zu sein, da für die Hauptzellen, die nicht in der Lage sind, Protonen ins Lumen zu verbringen, eine ebenfalls recht hohe Membranpermeabilität für NH_3^- gezeigt werden konnte [105]. Grundsätzlich bleibt festzuhalten, dass die Transportmöglichkeiten von Ammonium vielfältig zu sein scheinen, jedoch fast immer Transporter beteiligt sind, die als Hauptaufgabe eine Form des Kalium-Transports oder -Austausches vornehmen, da Ammoniak aufgrund der ähnlichen Molekülgröße und ebenfalls einfach positiven Ladung dessen Platz an der Bindungsstelle einnehmen kann.

1.6 Niere im Alter

Da die von uns untersuchten Versuchstiere im Schnitt älter als 80 Wochen waren, ist es wichtig, altersspezifische Befunde von Knockdown-bedingten Pathologien abzugrenzen:

Im Alter nehmen sowohl renaler Blutfluss, glomeruläre Filtrationsrate als auch Kreatininclearance ab [62, 71]. Es kommt vermehrt zu interstitieller Fibrose, Verlust von funktionellem Tubulusgewebe, Sklerosierung und Verlust von Glomeruli sowie zu Arteriosklerose der Nierengefäße [3]. Zusätzlich geht die Regenerationsfähigkeit und Entgiftungsfähigkeit des Nierengewebes zurück [3, 71, 73].

Auf hormoneller Ebene konnte ein vermindertes Ansprechen auf Renin, ADH sowie Aldosteron bei normalen Hormonkonzentrationen beobachtet werden, was zu einer verminderten Fähigkeit zur Urinkonzentrierung führt [62, 67, 79]. So konnte z.B. für AQP2 eine Expressionsverminderung um 50% gezeigt werden [79].

Auf ultrastruktureller Ebene konnten sowohl eine generelle Atrophie der Epithelzellen als auch kompensatorische Hypertrophien, fokale Epithelzellnekrosen und eine Verdickung der Basalmembran beschrieben werden [26].

Über mikroskopische Auffälligkeiten bei den Zellen des Säure-Base-Haushaltes im Alter gibt es leider kaum Erkenntnisse.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Für unsere Untersuchungen waren Ergebnisse zu jungen Mäusen des zuvor beschriebenen Claudin-16-Knockdown-Modells der Ausgangspunkt. Diese Tiere waren im Schnitt 5-25

Wochen alt und zeigten den typischen FHHNC-Phänotyp. So präsentierten die Tiere eine erhöhte Calcium- und Magnesiumausscheidung mit dem Urin, eine Hypomagnesiämie und in der von Kossa-Färbung Zeichen der Nephrocalcinose. Außerdem ließen sich eine Hypotonie, eine Hypokaliämie, ein azider Urin-pH sowie ein gesteigertes Plasma-Bicarbonat feststellen [38, 45]. Auf hormoneller Ebene waren im Vergleich zu den WT höhere Spiegel an Vitamin D3 und Aldosteron zu sehen. In radiologischen Untersuchungen konnten ebenfalls Auffälligkeiten in der Knochenstruktur im Sinne reduzierter Knochendichte gezeigt werden [45].

Aufgrund dieser festgestellten Auffälligkeiten in Bezug auf metabolische Parameter und den Säure-Base-Haushalt war es nun unser Anliegen, diese Untersuchungen an wesentlich älteren Mäusen (im Schnitt älter als 80 Wochen) durchzuführen. Zusätzlich sollte geprüft werden, ob es auf mikroskopischer Ebene in Bezug auf die Zellen der pH-Regulation und die Ionentransporter Auffälligkeiten gibt und wie diese im Vergleich zu den jüngeren Versuchstieren kompensiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Blutgasvollautomat	ECOSYS II – Eschweiler, Kiel, D
Dispergierer	IKA Ultra-Turrax T25 – IKA, Staufen, D
Flammenphotometer	EFOX 5053 – Eppendorf, Hamburg, D
Glas-Teflon-Potter	Potter S (#853 202) – B. Braun, Melsungen, D
Isofluran-Vaporisator	Dräger-Vapor 19.n – Dräger AG, Lübeck, D
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD – Leica, Wetzlar, D
Kryostat	CM3050S – Leica, Wetzlar, D
Lumineszenz-Analysator	LAS-3000mini – Fuji Photo Film, Düsseldorf, D
Messverstärker	FD223 – WPI, Sarasota, FL, USA
Mikroskope:	
• Fluoreszenz	Axiovert 200M – Carl Zeiss, Jena, D
• Tubulisortierung	MZ16 Stereomikroskop – Leica, Wetzlar, D
• Operation	M8 Discussion Stereo Zoom Microscope Typ 355110 – Wild Heerbrugg (Leica, Wetzlar, D)
• Tubulusperfusion	Axiovert 10 – Carl Zeiss, Jena, D
Osmometer	Micro-Osmometer, Model 210– Fiske Associates, Norwood, MA, USA
Photometer	Tecan Genios Microplate Reader – Tecan Group, Männedorf, CH
pH-Meter	Präzisions pH-Meter – Knick, Berlin, D
Rotationstisch	Stuart Scientific Mini Orbital Shaker SO5 – Sigma-Aldrich, München, D
Schüttelgerät	REAX 2000 und REAX top – Heidolph Instruments, Schwabach, D
Spannungsquelle	(SDS-PAGE/Consort E835 – Consort, Turnhout, Belgium, Western Blot)
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Spritzenwärmeinkubator	Physiologie der CAU zu Kiel (Werkstatt), Kiel, D
Thermoblock	Thermomixer comfort – Eppendorf, Hamburg, D
Western Blot Kammer	Mini Trans-Blot Cell – Bio-Rad, München, D
Zentrallaboranalysator	Hitachi Modular – Roche Diagnostics, Mannheim, D

2.1.2 Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, bei den Firmen Sigma-Aldrich (D), Merck (D), Serva (D), Roche (D), Roth (D), Walter CMP (D), Fluka (D) und Air Liquide (D) im höchsten chemischen Reinheitsgrad bezogen.

Liste spezieller Reagenzien:

BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6) carboxyfluorescein, Invitrogen AG, Carlsbad, USA
BGA	Qualitätskontrolle Liquichek Blood Gas Control Level 2– Bio-Rad, München, D
BGA Kalibrierlösung 1	BGA 1 (#4061020) – Eschweiler, Kiel, D
BGA Kalibrierlösung 2	BGA 2 (#4061030) – Eschweiler, Kiel, D
BGA Spüllösung	WASH 1 (#4061000) – Eschweiler, Kiel, D
Calciumgluconat-1-hydrat	D-Gluconsäure Kalziumsalz (#7502.1) – Roth, Karlsruhe, D
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid – Roche Diagnostics, Mannheim, D
Eindeckmedium	Molecular Probes SlowFade Gold – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Kryoschnitt Gewebeeinbettmedium	Tissue Freezing Medium, Jung (#020106926) Leica, Wetzlar, D
Größenstandard (Western Blot)	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (#SM1811) – Fermantas, St. Leon-Rot, D
Isofluran	Forene – Abbott, Wiesbaden, D
Kollagenase Typ II	PAN-Biotech, Aidenbach, D

Lumineszenz-Medium	ECL Advanced Western Blotting Detection Kit (#RPN2135) – GE Healthcare (Amersham), Braunschweig, D
PBS	Dulbecco's PBS (10x) without Ca ²⁺ & Mg ²⁺ (#H15-011) – PAA Laboratories, Pasching, A
Protease Inhibitor	Tabletten complete, Mini, EDTA-free (#04693124001) – Roche, Mannheim, D

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Ursprung	Verdünnung Immunhistochemie	Verdünnung Westernblot
NKCC2	AG Bachmann, Anatomie, Berlin, D	Meer- schweinchen	1:4000	-
β-ENaC	AG Loffing, Anatomie, Zürich, CH	Kaninchen	1:10000	-
vH⁺-ATPase	Jeppe Praetorius, Aarhus, DK	Kaninchen	1:800	1:2000
AE1	Carsten Wagner, Physiologie, Zürich, CH	Kaninchen	1:3000	1:3000
AQP2	Alamone Labs, Jerusalem, IL	Kaninchen	1:1000	-
Pendrin	Carsten Wagner, Physiologie, Zürich, CH	Kaninchen	1:500	1:3000
TRPV5 (982)	Veit Flockerzi, Homburg, D	Kaninchen	1:500	-
CAII	Santa Cruz Biotechnology, D	Schaf	1:500	-
Pan-Actin	Sigma-Aldrich, München, D	Kaninchen	-	1:5000

Antikörper	Bezugsquelle	Ursprung	Verdünnung Immunhistochemie	Verdünnung Westernblot
Alexa Fluor 488 goat anti guinea pig (#A11073)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Schaf	1:400	-
Alexa Fluor 594 goat anti rabbit (#A11037)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Schaf	1:400	-
donkey anti rabbit (#sc-2313)	Santa Cruz Biotechnology, Hedeilberg, D	Esel	-	1:10000
donkey anti guinea pig (#706- 035-148)	Dianovo, Hamburg, D	Esel	-	1:10000
Alexa Fluor 594 donkey anti goat (#A-11058)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Esel	1:400	-

2.1.4 Lösungsrezepte

<i>Dissektionslösung</i>		
Reagenz	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,44	140
KH ₂ PO ₄	136,9	0,4
K ₂ HP0 ₄ x 3H ₂ O	228,23	1,6
MgSO ₄ x 7H ₂ O	246,48	1
Na-Acetat x 3H ₂ O	136,08	10
α-Ketoglutarat	146,1	1
Ca-Gluconat x 1H ₂ O	448,4	1,3
in H ₂ O		
pH Einstellung auf pH 7,4 mittels NaOH / HCl		
<i>Kontrolllösung</i>		
Reagenz	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,44	120
KH ₂ PO ₄	136,09	0,4
K ₂ HP0 ₄ x 3H ₂ O	228,23	1,6
Glucose	180,16	5
MgCl ₂ x 6H ₂ O	203,3	1
Na-Gluconat	218,13	25
Ca-Gluconat x 1H ₂ O	448,4	3
in H ₂ O		
pH Einstellung auf pH 7,4 mittels NaOH / HCl		
<i>Inkubationslösung</i>		
Reagenz	Konzentration [mg/l]	
Glycin	375	
Trypsin-Inhibitor	48	
DNase I	25	
in Dissektionslösung		

<i>Sortierlösung</i>	
Reagenz	Konzentration [mg/ml]
Albumin (BSA)	0,5
in Inkubationslösung	
Aufreinigen mit Hilfe eines Sterilfilters	

<i>Enzymlösung</i>	
Reagenz	Konzentration [mg/ml]
Kollagenase Typ II	1,0
Protease Typ XIV	1,0
In Inkubationslösung	

<i>Lyse-Puffer</i>	
Reagenz	Konzentration [mg/l]
0,5% w/v Triton X-100	
1 Protease-Inhibitor-Tablette je 10ml	
in PBS	

<i>4x Probenauftragspuffer (nach Lämml)</i>	
Reagenz	Konzentration [mmol/l]
Tris / HCl	2
8% w/v SDS	
0,004% w/v Bromphenolblau	
40% v/v Glycerol	
20% v/v β -Mercaptoethanol	
in H ₂ O	
30 Minuten durchmischen und dabei 10 Minuten auf 55°C erwärmen	

4x Sammelgel-Puffer (SDS-PAGE)	
Reagenz	Konzentration [mmol/l]
Tris / HCl	0,50
0,4% w/v SDS	
in H ₂ O	
pH-Einstellung auf pH 6,8 mitler NaOH / HCl	

4% Sammelgel (SDS-PAGE)	
Reagenz	Volumen [ml]
40% Acrylamid	1,0
4x Sammelgel-Puffer	2,5
H ₂ O	6,4
30µl TEMED	
75µl 10% APS	

4x Trenngel-Puffer (SDS-PAGE)	
Reagenz	Konzentration [mmol/l]
Tris / HCl	1,5
0,4% w/v SDS	
in H ₂ O	
pH-Einstellung auf pH 8,8 mitler NaOH / HCl	

Trenngel (SDS-PAGE)		
Reagenz	Volumen [ml]	
	12,5%	8%
40% Acrylamid	6,25	4,00
4x Trenngel-Puffer	5,00	5,00
H ₂ O	8,54	10,79
60µl TEMED		
150µl 10% APS		

10x Elektrodenpuffer (SDS-PAGE)	
Reagenz	Konzentration [mol/l]
Glycin	1,92
Tris	0,25
1% w/v SDS	
in H ₂ O	

Transferpuffer (Tank-Blot-Puffer)	
Reagenz	Konzentration [mol/l]
Glycin	0,19
Tris	0,02
20% v/v Methanol	
in H ₂ O	
pH 8,3 (nicht einstellen)	

TBS-T (WesternBlot)	
Reagenz	Konzentration [mol/l]
Tris / HCl	0,10
NaCl	0,15
0,05% v/v Tween/Polysorbat 20	
in H ₂ O	
pH-Einstellung auf pH 7,6 mittels NaOH / HCl	

Stripping-Puffer (Western-Blot)	
Reagenz	Konzentration [mol/l]
Tris / HCl	0,1
2% w/v SDS	
in H ₂ O	
pH-Einstellung auf pH 6,7 mitler NaOH / HCl	

<i>Ammoniumchloridlösung</i>		
Reagenz	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,44	125
NH ₄ Cl	53,49	20
KH ₂ PO ₄	136,09	0,4
K ₂ HP0 ₄ x 3H ₂ O	228,23	1,6
Glucose	180,16	5
MgCl ₂ x 6H ₂ O	203,3	1
Ca-Gluconat	448,4	1,3
in H ₂ O		
pH Einstellung auf pH 7,4 mittels NaOH / HCl		

<i>Niedrig-Chlorid-Lösung</i>		
Reagenz	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,44	20
KH ₂ PO ₄	136,9	0,4
K ₂ HP0 ₄ x 3H ₂ O	228,23	1,6
Glucose	180,16	5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	246,48	1
Na-Gluconat	218,13	125
Ca-Gluconat x 1H ₂ O	448,4	8
in H ₂ O		
pH Einstellung auf pH 7,4 mittels NaOH / H ₂ SO ₄		

<i>Niedrig-Natrium-Lösung</i>		
Reagenz	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]
NMDG	195,2	140
NaCl	58,44	5
KH ₂ PO ₄	136,09	0,4
K ₂ HP0 ₄ x 3H ₂ O	228,23	1,6
Glucose	180,16	5
MgCl ₂ x 6H ₂ O	203,3	1
Ca-Gluconat x 1H ₂ O	448,4	1,3
in H ₂ O		
pH Einstellung auf pH 7,4 mittels HCl		

2.1.5 Software

Fluoreszenzimmunhistochemie

AxioVision 4.6 – Carl Zeiss, Jena, D

ImageJ – Wayne Rasband, Research Services
Branch, National Institute of Mental Health,
Bethesda, MD, USA

Fluorometrie

MetaFluor Ratio Imaging Software - Molecular
Devices, Sunnyvale, USA

Tabellenkalkulation

Excel 2003 – Microsoft, Redmond, WA, USA
OriginPro 7.5G – OriginLab, Northampton, MA,
USA

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Untersucht wurden Claudin 16-Knockdown-Mäuse und ihre altersentsprechenden Geschwistertiere. Die Versuchstiere wurden im Tierhaus des Physiologischen Institutes der CAU Kiel gemäß den geltenden Tierschutzbestimmungen gehalten, wo sie einen 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus durchliefen. Der Zugang zu Flüssigkeit und Nahrung erfolgte *ad libidum*.

Zur Identifizierung diente das transgenexprimierte GFP, das in fast allen Zellen der KD exprimiert wird. Dieses kann dann durch Beleuchtung mit einer 480 nm Taschenlampe und

einer Spezialbrille (520 nm Bandpass) sichtbar gemacht werden, was es möglich macht, KD von WT zu unterscheiden.

2.2.2 Probengewinnung (Urin, Blut, Nieren, Nebennieren, Knochen)

Die Versuchstiere wurden nach Entnahme aus der Transportbox in eine Narkosekammer umgesetzt, wo sie durch Verwendung des Inhalationsanästhetikums Isofluran in Narkose versetzt wurden. Hierbei wurde initial eine Dosis von 5,0 vol% Isofluran verwendet. Die Mäuse wurden dann auf den OP-Arbeitstisch transferiert, hier wurde die Narkose mit einer Maske und einer körperrgewichtsadaptierten Dosis von 2,5-3,0 vol% aufrechterhalten.

Es erfolgte zunächst ein Einschnitt in die Haut im unteren Abdomen, mit Freilegung des Peritoneums. Dieses wurde dann vorsichtig je in Richtung der unteren Extremitäten und über einen langen medianen Schnitt nach kranial eröffnet. Daraufhin wurde der Blasenurin mit einer Kanüle (0,4 mm) und Spritze abgezogen. Die intestinalen Organe wurden so weit wie möglich aus dem Situs ausgelagert, sodass nun die *Aorta* und die *vena cava* unter mikroskopischer Sicht mit feinen Pinzetten aus ihren bindegewebigen Strukturen freipräpariert werden konnten. Dann wurde mit einer zuvor heparinisierten und leicht abgeschrägten Kanüle (0,7 mm) und einer Spritze so viel Blut wie möglich aus der *vena cava* abgenommen. Danach erfolgten das Unterbinden der Aorta knapp oberhalb der Bifurkation in die Iliacalgefäße mit einer Gefäßklemme und ein kleiner, senkrechter Einschnitt kaudal der *arteriae renales* mit einer Federschere.

In diese Inzision wurde ein PE-Katheter eingeführt, der zuvor durch Hitze einwirkung auf einen Innendurchmesser von ca. 0,05 mm ausgezogen und mit einer Skalpellklinge abgeschrägt worden war. Dieser Katheter war über einen Schlauchadapter mit einer Spritze verbunden, die 0,5 ml zuvor auf 38 °C erwärmte Enzymlösung bestehend aus Kollagenase II und Protease XIV enthielt. Unter Führung einer Pinzette wurde dieser Katheter dann in die Inzisionsstelle eingeführt und unter gleichmäßigem Fluss wurde dann die Enzymlösung in die Nieren infundiert, wobei die zuvor eröffnete *vena cava* als Wiederaustrittspforte diente. Als Zeichen einer gelungenen Nierenperfusion zeigte sich hierbei dann deutliche Aufhellung des Nierenparenchyms.

Als nächstes erfolgte dann die beidseitige Nephrektomie am Nierenhilus mit einfacher Schere. Der Exitus der Versuchsmäuse trat noch während der Perfusion durch Entbluten über den Einschnitt in die Vena cava ein. Zusätzlich wurde final ein Thoraxschnitt zur sicheren Tötung durchgeführt.

Die entnommenen Nieren wurden zunächst in ein Zellkulturschälchen mit Inkubationslösung abgelegt und dann mit zwei feinen Pinzetten von ihrer Nierenkapsel befreit. Anschließend wurden sie horizontal mithilfe einer Skalpellklinge in ca. 0,2-0,5 mm dicke parallele Scheibchen geschnitten, wobei die Nierenpole jeweils verworfen wurden.

Ebenfalls erfolgte zeitgleich die Entnahme der Nebennieren, die aufgrund ihrer sattgelben Farbe leicht zu lokalisieren waren. Außerdem wurde bei einer Reihe von Versuchstieren noch zusätzlich der rechte *femur* exzidiert. Dies geschah durch Durchtrennung der muskulären und ligamentären Strukturen und anschließender Luxation des Hüftkopfes sowie des Kniegelenkes.

2.2.3 Metabolische Daten

2.2.3.1 Größe und Gewicht

Die Mäuse wurden vor der Narkoseeinleitung gewogen, außerdem wurde post mortem die Körperlänge (Abstand von Nasenspitze zu Schwanzwurzel: NSW) mit Hilfe eines Bindfadens und eines Millimetermaßes ausgemessen. Des Weiteren wurden der BMI (engl. *body-mass-index*) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Gewicht [mg]}}{\text{NSW}^2 [\text{cm}^2]}$$

Abbildung 14: Formel zur BMI-Berechnung

2.2.3.2 Blutgasanalyse

Die gewonnenen Blutproben wurden unverzüglich nach der Entnahme je mit einer Glaskapillare aufgezogen, um den Gasaustausch mit der Raumluft möglichst gering zu halten und einem Blutgasvollautomaten zugeführt. Hierbei wurden in der BGA folgende Werte gemessen:

- pH
- pCO₂
- HCO₃Aktuell
- BE

2.2.3.3 Uringanalyse

Nach demselben Verfahren wurden in der Uringanalyse folgende Werte bestimmt:

- pH
- pCO₂
- HCO₃Aktuell

2.2.3.4 Bestimmung des Hämatokrits

Eine geringe Menge des Vollblutes wurde in eine Mikro-Hämatokrit-Kapillare aufgezogen und bei 12000 rpm 2 Minuten lang in einer Hämatokrit-Zentrifuge zentrifugiert.

Der Anteil der korpuskulären Elemente wurde mit einem Milimetermaß ausgemessen und durch die Größe der Gesamtsäule geteilt.

2.2.3.5 Gewinnung von Plasma

Das Hämatokrit-Proberöhrchen wurde mit einem Glasschneider aufgetrennt und das Plasma abgezogen. Weiter wurde das verbliebene Vollblut bei 13000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert. Im Anschluß wurde der Plasmaüberstand abpipettiert. 180 µl wurden zur Analyse gestellt, 22 µl wurden für die Analyse der Plasmaosmolalität bereitgestellt. Das verbliebene Plasma wurde bei -20 °C zur späteren Verwendung tiefgefroren.

2.2.3.6 Gewinnung von Urinproben

Nach Abschluß der Uringasanalyse wurden von dem verbliebenen Blasenurin 50 µl abgezogen und mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:6 verdünnt (300 µl) und für die weitere Laboranalyse bereitgestellt. Außerdem wurden 50 µl Urin zur Bestimmung der Plasmaosmolalität abpipettiert. Der verbliebene Urin wurde ebenfalls tiefgefroren.

2.2.3.7 Bestimmung der Plasma- und Urinosmolalität

Die gewonnenen Proben wurden in einem Osmometer mittels Gefrierpunkterniedrigung analysiert. Das Gerät wurde vor jeder Meßreihe geeicht und die zu messenden Proben wurden halbiert und jeweils im Verhältnis 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt, sodass jede Probe jeweils doppelt bestimmt wurde und dann entsprechend des obengenannten Verdünnungsverhältnisses zurückgerechnet wurde.

2.2.3.8 Laboranalyse von Plasma und Urin

Die zunächst bei -20 °C gelagerten Proben von Plasma und Urin wurden gekühlt ins Zentrallabor des UKSH (Campus Kiel) verbracht und dort auf folgende Analyte untersucht:

- Natrium
- Kalium
- Chlorid
- Calcium
- Magnesium
- Phosphat
- Harnstoff
- Kreatinin
- Glucose

Die Ergebnisse der Urinanalyse wurden mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

2.2.3.9 Berechnungen metabolischer Parameter

Alle bestimmten Parameter im Urin wurden auf das im Urin ausgeschiedene Kreatinin nach der folgenden Formel normiert, um die Konzentrationsunterschiede auszugleichen und einen Eindruck der renalen Ausscheidung zu gewinnen:

$$\frac{U_x}{U_{\text{crea}}} = \frac{x \text{ im Urin } \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right]}{\text{Kreatinin im Urin } \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right]}$$

Abbildung 15: Formel zur Normierung auf Kreatinin

Zusätzlich wurden die fraktionellen Ausscheidungen (synonym: Fraktionelle Exkretion FE), die den Anteil der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge eines Stoffes an der glomerulär filtrierte Menge dieses Stoffes angeben, nach der folgenden Formel berechnet:

$$FE_x[\%] = \frac{x \text{ im Urin } \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right] \times \text{Kreatinin im Plasma } \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right] \times 100\%}{x \text{ im Plasma } \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right] \times \text{Kreatinin im Urin } \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right]}$$

Abbildung 16: Formel zur Berechnung der Fraktionellen Exkretion

Abgegangener Faeces wurde eingesammelt und zunächst bei -20 °C gelagert. Dann wurden die Proben einzeln gewogen, für einen Tag in einem Trockenschrank bei ca. 70 °C gelagert und anschließend erneut gewogen. Dieser Vorgang wurde insgesamt noch zweimal wiederholt, bis sich das Gewicht nicht mehr änderte, sodass nun aus der Differenz der Wassergehalt des Faeces berechnet werden konnte. Anschließend wurden die Proben für WT und KD jeweils gepoolt, mit dem zehnfachen ihres Gewichtes an destilliertem Wasser verdünnt, zerkleinert und homogenisiert. Nach Zentrifugation 10 Minuten lang bei 7000 rpm wurde der Flüssigkeitsüberstand abpipettiert und in neue Probengefäße überführt. Dann wurden die Proben flammenphotometrisch auf ihren Gehalt an Natrium, Kalium und Calcium untersucht, wobei für jeden Pool je fünf Messungen vorgenommen wurden.

2.2.3.10 Nebennieren

Die entnommenen Nebennieren wurden von Bindegewebe befreit, ebenfalls erst bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischengelagert und später ihr Gewicht auf der Feinwaage bestimmt.

2.2.3.11 Oberschenkelknochen

Ebenso wurden die Oberschenkelknochen der Mäuse zunächst bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefroren, um später dann von Resten von Muskel- und Sehngewebe befreit zu werden. Dies geschah unter wiederholtem Abkochen des Knochens in destilliertem Wasser in einer Mikrowelle bei ca. $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, wobei das Gewebe dann mit einer feinen Pinzette manuell abgetragen wurde. Des Weiteren wurden die Kniegelenke von etwaigen Resten des Bandapparates und Knorpels befreit. Anschließend wurden die Maße der gereinigten Knochen mit einer Schiebelehre gemessen. Es wurden folgende Parameter bestimmt (siehe Abb. 17):

- Durchmesser des oberen Anteils des Kniegelenkes von lateral nach medial (Anstand der Außenseiten der Femurkondylen)
- Durchmesser des oberen Anteils des Kniegelenkes von frontal nach dorsal
- Gesamtlänge des Knochens von der Spitze des *trochanter major* zur Unterseite der Femurkondylen

Des Weiteren wurde das Gesamtgewicht der Oberschenkelknochen auf einer Feinwaage bestimmt.

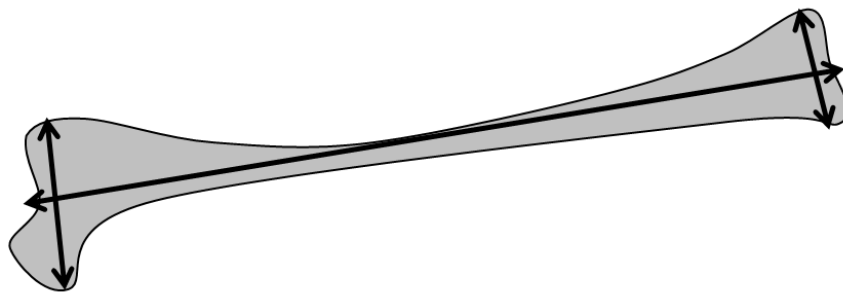


Abbildung 17: Messung des Oberschenkelknochens
Eingezeichnet sind die drei gemessenen Parameter

2.2.4 Identifizieren und Separieren der Tubulussegmente

Die zuvor geschnittenen, perfundierten Nierenscheibchen wurden in ein 2 ml-Reagenzgefäß mit den verblieben 1,5 ml Enzymlösung des Kollagenase/Protease- Gemisches, das ebenfalls auf $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmt worden war, gegeben und initial bei 850 rpm 10 Minuten lang

geschüttelt. Durch die fortgeführte enzymatische Verdauung lösten sich hierbei die Tubulussegmente aus ihrem bindegewebigen Verband und wurden als trüber Überstand im Gefäß sichtbar.

Dieser Überstand wurde nach 10 Minuten Schütteln und im Anschluß nach je 5 weiteren Minuten Schütteln mit einer verkürzten und abgestumpften Pasteurpipette abgenommen und je in ein weiteres Reagenzgefäß, in dem sich 1 ml Sortierlösung befand, gegeben. Das abgenommene Volumen wurde durch vorerhitzte (38 °C) Inkubationslösung ersetzt. Die Reaktionsgefäße wurden dann zunächst auf Eis gelagert und es wurde abgewartet, bis die Tubuli auf den Boden des Gefäßes abgesunken waren, sodass der entstandene, mit Proteolyseprodukten verunreinigte Überstand dann nochmals abgezogen, verworfen und durch Sortierlösung ersetzt werden konnte. Dieser Vorgang wurde bis zu siebenmal wiederholt, sodass letztendlich bis zu acht Gefäße mit enzymatischen und durch mechanisches Schütteln dissezierten Tubuli bereitstanden.

Der Bodensatz wurde im Folgenden jeweils aufgewirbelt, um die Tubuli wieder in Suspension zu bringen, woraufhin je ca. 0,5 ml abgezogen und auf einem zuvor mit 3 ml Sortierlösung gefüllten Zellkulturschälchen verteilt wurden. Dieses wurde dann auf eine wassergekühlte, kaltlichtbelichtete Oberfläche transferiert und stereomikroskopisch betrachtet.

Für unsere Arbeit waren von allen Tubulus-Segmenten nur TAL, CD und DCT von Interesse. Diese wurden mit einer geschliffenen Dumont-Pinzette vorsichtig voneinander separiert. Grundsätzlich waren die TAL stets recht leicht zu identifizieren (am dünnsten, lang, blass), wohingegen bei der Auswahl der CD's nur solche in Betracht gezogen wurden, die eine Verzweigung aufwiesen, da dieses Merkmal exklusiv den CD's vorbehalten ist. Das klassische Pflastersteinrelief war bei alten Mäusen nicht unbedingt ein zuverlässiger Marker (siehe Abb. 39).

Bei den DCT wurden nur diejenigen in Betracht gezogen, die noch immer mit dem CNT oder der TAL verbunden waren und anschließend von diesen abgeschnitten.

Des Weiteren wurden die Sammelrohre mit einer Digitalkamera durch das Objektiv hindurch mit identischem Abstand und Vergrößerung fotografiert.

2.2.5 SDS-Page und Westernblot

2.2.5.1 Probengewinnung

In einer Versuchsreihe wurden unter dem Mikroskop CDs für die Proteinanalyse gesammelt. Es wurden dabei Probengefäße mit jeweils 10 oder 20 mittelgroßen Sammelrohren bestückt und zunächst auf Eis gelagert. Sobald eine ausreichend Anzahl zusammengetragen worden war, wurde nach Zentrifugation das Volumen an überstehender Sortierlösung auf maximal 20 µl reduziert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl Laemmli-Puffer zu den Proben, die dann 30 Minuten lang bei 65 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 1400 rpm inkubiert wurden.

2.2.5.2 SDS-Page/Westernblot

Westernblotanalysen wurden nach Standardprotokoll durchgeführt. Dazu wurden die unter 2.5.2.1 beschriebenen Proben durch Elektrophorese aufgetrennt (8% oder 12,5% Trenngele, jeweils 4% Sammelgele). Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe des Tankblot-Verfahrens auf 0,4 µm Nitrozellulosemembranen überführt (500 mA, 75 min). Überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran wurden durch Inkubation im Blockingpuffer (5%-Magermilchpulver in TBS-T) 30 Minuten lang bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend wurden die Blotmembranen mit den entsprechenden Primärantikörpern (siehe 2.1.3) über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Die Inkubation mit Sekundärantikörpern (siehe 2.1.3) erfolgte dann nach ausgiebigem Waschen 60 Minuten lang unter Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen wurden die Westernblots gemäß Herstellerangaben an einem Lumineszenzanalysator (LAS 3000, Mitbenutzung des Geräts der AG Saftig, Biochemie, CAU Kiel) entwickelt. Nach erneutem ausführlichem Waschen und Strippen (30 °C, 50 °C im Strippingpuffer) wurde mit einem Pan-Actin-Antikörper als zweitem Primärantikörper ebenfalls über Nacht bei 4 °C inkubiert und dann analog weiterbehandelt und entwickelt.

2.2.5.3 Auswertung

Mit Hilfe des Probenstandards erfolgte die Zuordnung der Größe der Proteinbanden. Daraufhin wurden die Bilder der Membranen sowohl für die zu untersuchenden Proteine als auch für das *Housekeeping*-Protein Actin mit der Gel-Analyzer-Funktion der ImageJ-Software quantitativ ausgewertet und dann miteinander ins Verhältnis gesetzt, sodass nach dieser Normierung auf das Actin die Proben (als relative Intensität) untereinander

vergleichbar waren. Zur Auswertung wurden hier nur Proben herangezogen, bei denen sowohl die Bande für das zu untersuchende Protein als auch die Bande für das zugehörige Actin eindeutig zu identifizieren und zuzuordnen waren.

2.2.6 Histologische Verfahren

2.2.6.1 Immunfluoreszenz

2.2.6.1.1 Prinzip der Fluoreszenz-Immunhistochemie

Bei der Fluoreszenz-Immunhistochemie werden Zielproteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Wir nutzten für unsere Färbungen die indirekte Fluoreszenz-Immunhistochemie (siehe Abb. 18).

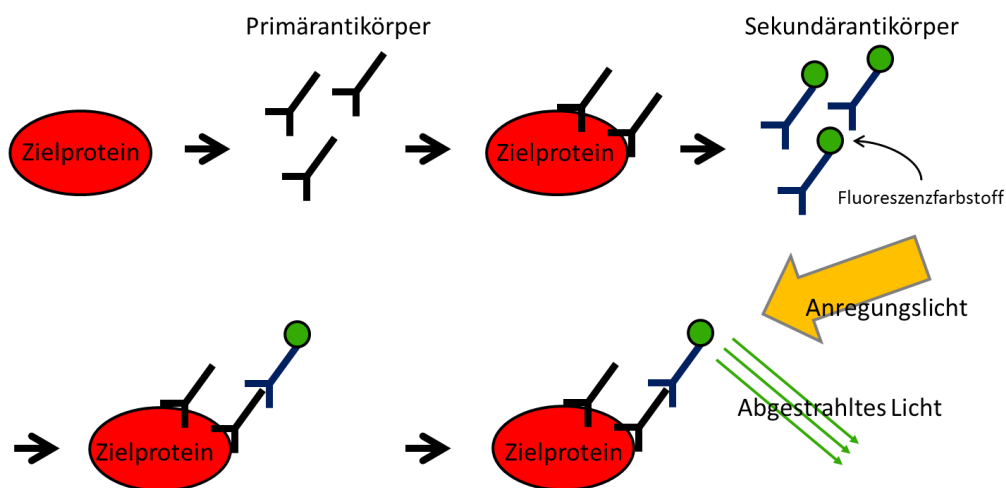


Abbildung 18: Prinzip der indirekten Fluoreszenz-Immunhistochemie

Nach der Bindung eines Primärantikörpers an das Zielprotein wird das Präparat mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser ist gegen den Primärantikörper gerichtet und beinhaltet einen Fluoreszenzfarbstoff, der unter Anregungslicht ein Fluoreszenzsignal einer bekannten Wellenlänge emittiert

Für unsere Untersuchungen wurden anhand der unter 2.2.4 genannten Kriterien CDs und TALs gesammelt. Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass hierbei für die Immunfärbungen besonders kleine Bruchstücke und stark angebaute CDs von Vorteil waren. So wurden längere Tubuli auf eine Größe von ca. 200-250 μm zurechtgeschnitten. Die gesammelten Stücke wurden dann mit Hilfe einer abgeschrägten Pasteurpipette (70°) aufgesogen und auf einem Objektträger (OT) transferiert. Pro OT wurde eine Menge von 7-10 Tubulusstückchen

angestrebt. Die TALs wurden ebenfalls auf eine Länge von ca. 600 µm kleingeschnitten und es wurde eine Menge von ca. 20 Zuschnitten pro OT aufgetragen. Diese wurden danach auf Eis. Sobald eine ausreichende Menge an OT produziert worden war, wurden jeweils 20 µl Paraformaldehyd (PFA) 4% auf die OT zur Fixierung gegeben. Im Anschluß wurden diese vorsichtig mit destilliertem Wasser mehrfach gespült, um zum einen die PFA-Reste abzuwaschen und zum anderen Salzkristallbildung aus den Rückständen der Sortierlösung zu verhindern.

2.2.6.1.2 Immunfluoreszenz von Kryoschnitten

Neben der Färbung intakter isolierter Tubulussegmente wurden ebenfalls konventionelle Kryoschnitte ganzer Nieren der Versuchstiere angefertigt.

Das Material für diese Schnitte entstammte einer vorherigen Versuchsreihe mit Tieren vergleichbaren Alters, bei denen intraoperativ in den linken Ventrikel 4% PFA zur Perfusionsfixierung injiziert wurde. Die Nieren wurden dann entnommen, 1-2 mm dicke, horizontale Schnitte angefertigt, die anschließend in eine 10 mm breite Form aus Aluminium gegeben und mit Einbettmedium aufgefüllt wurden. Diese wurden mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C aufbewahrt und mir dann bereitgestellt.

Aus den tiefgekühlten Proben wurden jeweils 3 µm dicke Schnitte hergestellt, wobei es von besonderer Wichtigkeit war, dass die Schnittfläche so gestaltet war, dass die Medulla zentral mit angeschnitten war.

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Kryoschnitte unter leichtem Schütteln 10 Minuten lang in einem 7:3 Gemisch aus Methanol und Aceton inkubiert.

2.2.6.1.3 Färbeprotokoll und verwendete Antikörper

Die OT mit isolierten Tubuli und Kryoschnitten wurden dann zunächst in eine Küvette überführt und auf einem Schütteltisch dreimal fünf Minuten lang mit PBS-T (0,3 % Triton X-100 in PBS) gewaschen.

Nach Abschluß dieses Vorganges wurden die OT in eine andere Küvette überführt, die dann mit einem Überstand an Zitronensäurelösung aufgefüllt (0,01 mol/l, pH 6,0) und in einer Mikrowelle 6-8 Minuten lang gekocht wurde.

Der Zitronensäure wurde daraufhin abgegossen und sobald die OT hinreichend ausgekühlt waren, wurden sie vorsichtig mit einem Papiertuch im Randbereich getrocknet und die Primärantikörper mit einer Pipette hinzugefügt.

Dabei wurden für die Kryoschnitte und CD's jeweils 100 µl PBS-T mit 1% BSA pro OT mit je einem Antikörper gegen folgende Antigene aufgetragen:

- AQP2
- vH⁺-ATPase
- β-ENaC
- AE1
- Pendrin

In den 100 µl waren außerdem 0,5 µl CAII-Antikörper bei allen Färbungen als Zweitfärbung enthalten (siehe hierzu Abschnitt 2.1.3.).

Für die TAL wurde je ein OT mit NKCC2 gefärbt, aber jeweils ohne die Zweitfärbung mit CAII-Antikörpern.

Bei den Kryoschnitten wurde neben den oben genannten sechs Antigenen auch noch der Calcium-Kanal TRPV5 gefärbt.

Hierbei stellte sich heraus, dass es für die Färbung essentiell war, die Reihenfolge des Waschens und des Kochens in Zitronensäure umzukehren. So wurde hier dann erst gekocht und dann gewaschen. Außerdem wurde auch bei dieser Färbung auf die Zweitfärbung mit dem CAII-Antikörper verzichtet.

Im nächsten Schritt wurde jeder OT mit einem Deckglas versehen und mit den Primärantikörpern über Nacht bei -4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die OT mit PBST gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in einer Konzentration 1:400 aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend erfolgte erneutes dreimaliges Waschen in PBST je 5 Minuten lang.

Dann wurden pro OT jeweils ca. 30 µl Eindeckmedium aufgetragen, in das zuvor im Verhältnis (1:2000) DAPI gegeben wurde, ein gegen Zellkernbestandteile gerichteter Fluoreszenz-Farbstoff.

Auf das noch flüssige Eindeckmedium wurde dann ein Deckglas aufgesetzt und die OT wurden über Nacht lichtgeschützt getrocknet.

2.2.6.1.4 Auswertung der Färbungen

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte durch Laserscanning-Mikroskopie am Zeiss LSM 510 und der dazugehörigen Software. Zunächst wurden bei der Durchmusterung des Präparates die jeweils bestgefärbten Tubuli ausgewählt, wobei insbesondere darauf Wert gelegt wurde, dass die Färbung gleichmäßig und das Lumen sauber abgrenzbar ist. Dann wurde bei kontinuierlicher Aufzeichnung diejenige Ebene eingestellt, in der die Färbung die höchste Intensität aufwies, sodass das Programm daraufhin den Kontrast daran automatisch anpassen konnte.

Mit der *Crop*-Funktion konnte die *region of interest* ausgewählt, vergrößert und dann der zu messende Bereich so eingestellt werden, dass die Tubuli in ihrem gesamtem Durchmesser aufgezeichnet wurden.

Von diesen wurden dann sogenannte *stacks* angefertigt. Dabei handelt es sich um eine Reihe von ca. 20-30 Bildern von Schnitten durch den Tubulus, die im Anschluß flüssig durchgemustert werden können.

Mit Hilfe dieser *stacks* war es nun möglich, in den Tubuli jeweils Zellen auszuwählen, die sich zur standardisierten Auswertung der Färbungen eigneten.

Kriterien waren hier zum einen, dass die Zellen möglichst orthograd angeschnitten waren, d.h., vom Lumen bis zur basolateralen Seite reichten und dass der Zellkern klar zentral abgrenzbar war.

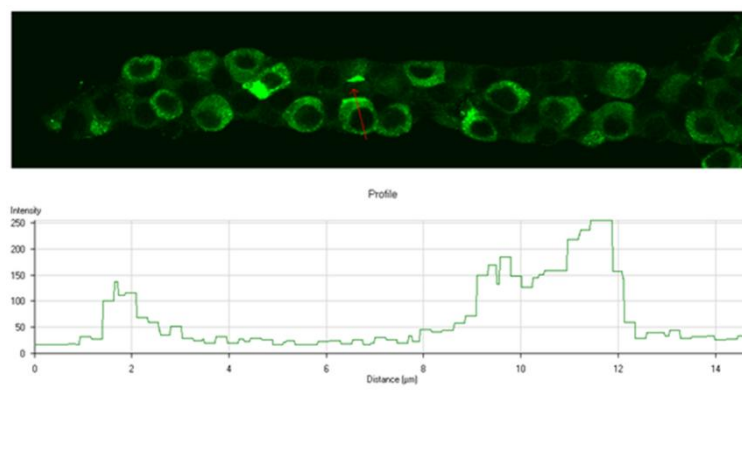


Abbildung 19: Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen

Diese Abbildung zeigt beispielhaft die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen mittels LSM-Software. Der obere Teil zeigt einen Tubulus mit Färbung gegen Pendrin. Es wurde eine Zelle ausgewählt und durch einen Vektor (roter Pfeil) markiert. Die Abbildung darunter zeigt die Färbeintensität entlang eines Vektors. Es wird deutlich, dass diese sich polar verteilt, mit erhöhtem Vorkommen jeweils im Bereich der Zellmembranen.

Es wurden dann sogenannte *profiles* der Zellen erstellt, dabei handelt es sich um Histogramme der Verteilung der Immunfluoreszenzfärbung über die Zelle (siehe Abb.19). Dabei war die Stärke der Färbung in *intensity-units* angegeben, mit möglichen Werten von 0 bis 250. Bei jeder Maus wurden je zwei bis vier Zellen aus zwei bis drei Tubuli ausgewertet, sodass insgesamt, je nach Antikörper, eine Anzahl von 20-40 Zellen erfasst wurde. Die Intensitäten durften hierbei einen Wert von 250 nicht überschreiten. Dies wurde durch die oben genannte automatische Anpassung des Kontrastes vermieden.

Neben der graphischen Darstellung als Histogramm lieferte das Programm auch tabellarisch die Zahlenwerte der Intensitäten. In diesen wurden dann die Zellgrenzen anhand des maximalen Intensitätenanstieges festgelegt, wobei jeweils von der luminalen oder basolateralen Seite ausgehend (je nach Vorkommen des jeweiligen Transporters) ein

bestimmter Grenzwert an Intensität, basierend auf den Erfahrungen der optischen Analyse, bestimmt wurde.

Dies war relativ leicht möglich, da im Lumen und jenseits der basolateralen Zellgrenzen die Intensität nahezu 0 war, wohingegen in die jeweiligen Zellmembranen aufgrund des Einbaus der Transporter sehr hohe Intensitäten aufwiesen. Für die verschiedenen Antikörper wurden folgende Grenzwerte gewählt:

- Pendrin: 30
- vH⁺-ATPase: 20
- β-ENaC: 35
- AE1: 30
- NKCC2: 30

Hiernach wurden für jede einzelne Zelle je für den letzten 1 μm und die letzten 5 μm ausgehend von der Zellgrenze in den *tables* die Werte für Distanz in μm und Intensität ausgeschnitten und in das Programm origin-pro 7.5G in eine Tabelle übertragen. Aus diesen Tabellen wurden dann Graphen mit der Distanz auf der x-Achse und der Intensität auf der y-Achse erstellt, um dann mit der 0 als Basislinie die *area under the curve* (AUC) mittels Integration zu berechnen.

Anschließend wurde der Wert für den letzten 1 μm durch den der letzten 5 μm dividiert und somit das Verhältnis der Intensitäten gebildet, wobei der erste μm ab der Zellgrenze die Plasmamembran und ihre Bestückung mit Transportproteinen repräsentiert und die letzten 5 μm das Zytoplasma. Das Verhältnis dieser beiden Intensitätswerte diente als Maß für den membranständigen Anteil der Transporter und Kanäle. Die ermittelten Werte wurden dann tabellarisch in Microsoft Excel aufgelistet und statistisch analysiert.

Die AQP2-Färbungen der isolierten Tubuli waren mit dieser Methode nur unzureichend auswertbar, da sich die Färbung größtenteils intrazellulär verteilte und die luminale Membran nur abgeschwächt angefärbt wurde. Daher wurden bei dieser Färbung nur für 4-6 Tubuli pro Maus das Zahlenverhältnis von Haupt- zu Schaltzellen durch Auszählen bestimmt.

Für die Kryoschnitte wurde zur Auswertung auf dasselbe etablierte Verfahren zurückgegriffen, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen. Bei der Auswahl der Zellen ist allerdings zu beachten, dass es sich hierbei um Schnitte ganzer Nieren handelte, sodass alle Tubulusabschnitte vertreten waren, wohingegen es sich bei den isolierten Tubuli vornehmlich

um kortikale Abschnitte handelte. Dieser Unterschied war insofern von Bedeutung, als für einige Transportproteine ihre Verteilung für Cortex und Medulla getrennt betrachtet werden musste.

Hier erfolgte die Auswertung von jeweils fünf Zellen pro Versuchstier, wobei die Zellgrenzen bei folgenden Intensitäten festgelegt wurden:

• Pendrin	50
• AE1	50
• vH ⁺ -ATPase kortikal	50
• vH ⁺ -ATPase medullär	50
• AQP2	30
• NKCC2	30
• β-ENaC	50
• TRPV5	30

Die Unterschiede in den Zellgrenzen lagen darin begründet, dass sich das Färbeverhalten isolierter Tubuli und von Kryoschnitten in Bezug auf Antikörperzugänglichkeit und vor allem auf die Verfälschung durch Färbung des Hintergrundes unterschieden. Um diesen Einflüssen gerecht zu werden, wurden die Intensitäten für die Zellgrenzen deshalb teilweise deutlich höher angesetzt.

2.2.7 Tubulusperfusion

Versuche an isoliert perfundierten Sammelrohren wurden zusammen mit Frau Dr. Nina Himmerkus durchgeführt.

2.2.7.1 Vorbereiten der Sammelrohre

Einige Sammelrohre wurden für die Perfusion ausgewählt, wobei hier besondere Anforderungen an ihre Qualität gestellt wurden: Der Querdurchmesser musste in einem Bereich 15-20 µm liegen, die Länge bei ca. 300-500 µm und der Tubulus musste in seiner Gänze intakt sein, sprich ohne etwaige Löcher oder Anzeichen enzymatischer Verdauung.

Tubuli, die diesen Kriterien entsprachen, wurden mit Hilfe der Transferpipette in eine Lochplatte übertragen, in der jeweils 0,5 ml einer Lösung mit 10 µmol/l BCECF (2'-7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein) in Sortierlösung vorgegeben waren.

Die Zellen wurden ca. 20 Minuten lang mit dem pH-Indikator inkubiert, sodass eine ausreichende Beladung gewährleistet war. Anschließend wurden die Tubuli mit der Transferpipette an den Perfusionsarbeitsplatz übertragen.

2.2.7.2 Perfusionsarbeitsplatz

Bei dem Perfusionsarbeitsplatz handelt es sich um ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop, durch das ein Bad betrachtet wird, in das die Tubuli transferiert wurden. Dieses wird für die Dauer des Experimentes mit Kontrolllösung perfundiert. Der Badfluß wurde kontinuierlich bei 5-8 ml/min gehalten, die Badtemperatur bei 37 °C.

In das Bad wurde dann das Perfusionssystem eingefahren. Dies beinhaltet als Kernstück eine doppeläufige Perfusionspipette, mit einem Kerndurchmesser von ca. 10 µm. Über beide Schenkel ist es dann möglich, den Tubulus mit einer Versuchslösung zu perfundieren. Die elektrische Messung wird weiter unten beschrieben.

Die Perfusionspipette wird von einer Konstriktionspipette umschlossen, die dazu dient, den Tubulus anzusaugen und dann zu fixieren. Diese wurde an der Mikroschmiede mit einem Innendurchmesser von ca. 22-23 µm hergestellt. Umgeben werden diese beiden Bauteile zum Schutz von der sogenannten Sylgard-Pipette.

Auf der anderen Seite des Bades befindet sich ebenfalls eine Pipette. Sie dient dazu, den Tubulus auf der gegenüberliegenden Seite des Systems im Bad zu fixieren.

Insgesamt erlaubt uns dieses System, einen eingespannten Tubulus je nach Bedarf luminal und basolateral unabhängig zu perfundieren (siehe Abb. 20).

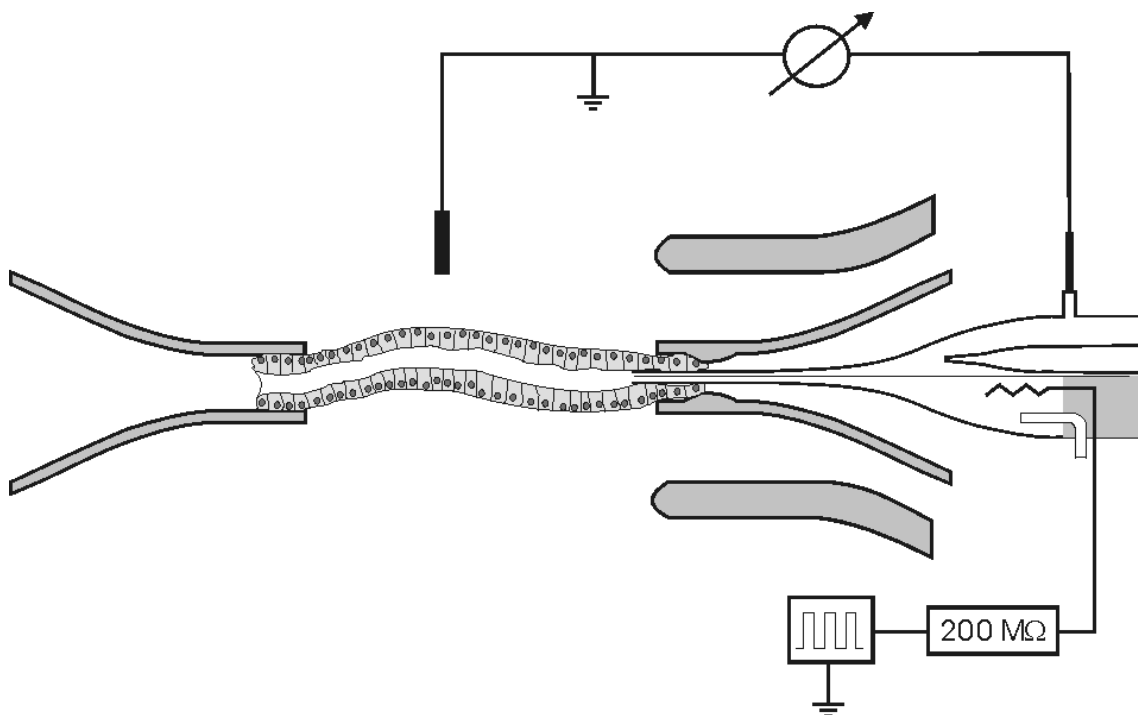


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Perfusionssystems

Eine doppelläufige Perfusionsspipette wird zur Perfusion in den Tubulus eingeführt (rechts). Durch einen Schenkel erfolgen Strominjektionen (Injektionselektrode und Pulsgenerator mit Vorwiderstand unten) und durch den anderen die Spannungsmessung (Badelektrode, Messelektrode und Messverstärker oben). Beide Schenkel verfügen über die Möglichkeit der Perfusion. Zum Ansaugen und Fixieren des Tubulus dient eine Konstriktionspipette, von der die doppelläufige Perfusionsspipette umschlossen wird. Die Sylgard-Pipette dient vornehmlich dem Schutz des Systems. Auf der gegenüberliegenden Badseite (links) befindet sich die Haltepipette.

Durch die doppelläufige Perfusionsspipette ist es möglich, über einen Schenkel das transepitheliale Potenzial (ΔV_{te}) gegen die Badlösung zu messen und über den anderen Schenkel einer rechteckigen Stromimpuls bekannter Größe (I_0) zu applizieren. ΔV_{te} wird hierbei über einen Meßverstärker amplifiziert und durch einen Papierschreiber aufgezeichnet. Aus diesen Werten läßt sich dann der transepitheliale Widerstand (R_{te}) berechnen.

Da sich der Tubulus bei dieser Versuchsanordnung wie ein Kabel verhält, wird R_{te} nach folgender Kabelgleichung berechnet [29]:

$$R_{te} = \sqrt{\pi p \lambda^3 \frac{\Delta V_{te}}{I_0} \tanh \frac{L}{\lambda}} \quad [\Omega \text{ cm}^2]$$

Abbildung 21: Formel zur Berechnung des transepithelialen Widerstandes

p = spezifischer elektrischer Widerstand der Perfusionslösung, L = Tubuluslänge, λ = Längskonstante

Die Längskonstante wird wie folgt berechnet [29]:

$$\lambda = \frac{\Delta V_{te} \pi r^2}{I_0 \rho} \quad \text{für } L / \lambda > 3 \text{ [cm]}$$

Abbildung 22: Formel zur Berechnung der Längskonstante
r = innerer Radius des Tubulus

Nach dem Ohm'schen Gesetz ist es dann möglich, den äquivalenten Kurzschlussstrom (I'_{sc}) zu berechnen [29]:

$$I'_{sc} = V_{te} / R_{te} \text{ [}\mu\text{A / cm}^2\text{]}$$

Abbildung 23: Formel zur Berechnung des Kurzschlußstromes

Der I'_{sc} stellt ein Maß für den elektrogenen Transport über den Tubulus dar.

2.2.7.3 Intrazelluläre pH-Messung mit Hilfe der Fluorometrie

Bei BCECF handelt es sich um einen ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff mit dessen Hilfe sich der intrazelluläre pH (pH_i) der Tubuluszellen fluorometrisch bestimmen läßt. BCECF wird mit Licht der Wellenlänge 490 nm und 440 nm angeregt. Die Intensität des wieder emittierten Lichtes ist für die Anregungswellenlänge 490 nm pH-sensitiv, während die Anregungswellenlänge 440 nm am isosbestischen Punkt des Farbstoffes liegt. Mit Hilfe der Metafluor-Software wurden im 5-Sekunden-Takt Fluoreszenzbilder beider Wellenlängen aufgenommen, welche anschließend weiter ausgewertet werden konnten.

Dafür wurden im Programm jeweils Zellen als *region of interest* markiert, deren pH_i -Verlauf während der verschiedenen Experimente aufgenommen wurde (siehe Abb. 24). Dieser wurde in Microsoft Excel in zeitlich definierten Abständen aufgezeichnet und anschließend statistisch ausgewertet.

Es wurde versucht, jeweils mindestens von drei Versuchstieren pro Population zwei bis vier Tubuli zu perfundieren, an denen dann jeweils mindestens 4 Zellen aufgezeichnet wurden, sodass pro Versuch und Tierkollektiv eine Zahl n von nicht weniger als ca. 30 Zellen erreicht werden konnte.

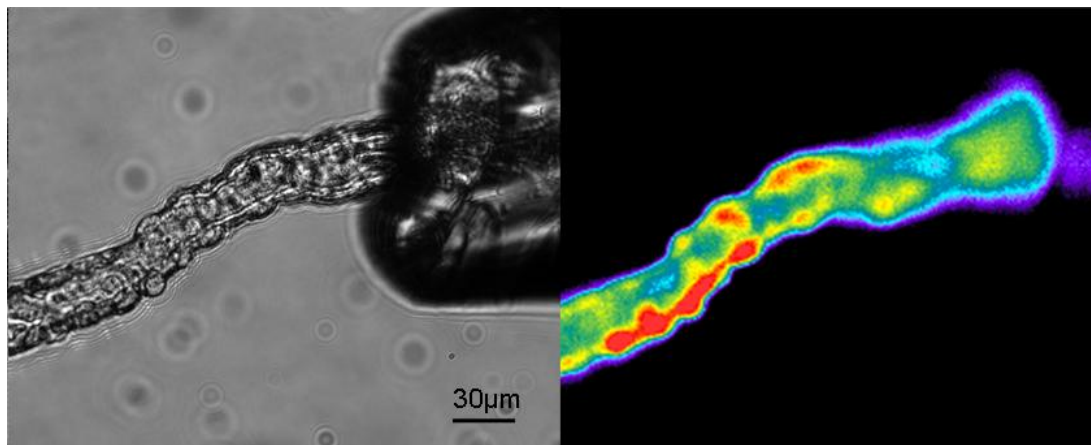


Abbildung 24: Tubulusperfusion

Auf der linken Bildseite Originalaufnahme eines in die Konstriktionspipette eingespannten Tubulus. Man beachte das deutlich erkennbare Tubuluslumen. Auf der rechten Seite Fluoreszenzmessung mit BCECF. Dieser Stoff fluoresziert in Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert. Bereiche mit niedrigen pH-Werten werden rot/gelb codiert, Bereiche mit hohen Werten blau/grün.

2.2.7.3.1 Fluorometrische Versuche

Die isoliert perfundierten Sammelrohre wurden jeweils 5-6 Minuten lang mit den folgenden Versuchslösungen superfundiert (siehe Abb. 25):

- Kontrolllösung von basolateral und luminal
- 20 mmol/l Ammoniumlösung von basolateral
- 20 mmol/l Ammoniumlösung mit 5 mmol/l Bariumchlorid von basolateral
- 5 mmol/l Natriumlösung von basolateral
- 5 mmol/l Chloridlösung von basolateral (unter 5% CO₂-Begasung)
- 5 mmol/l Chloridlösung von luminal (unter 5% CO₂-Begasung)

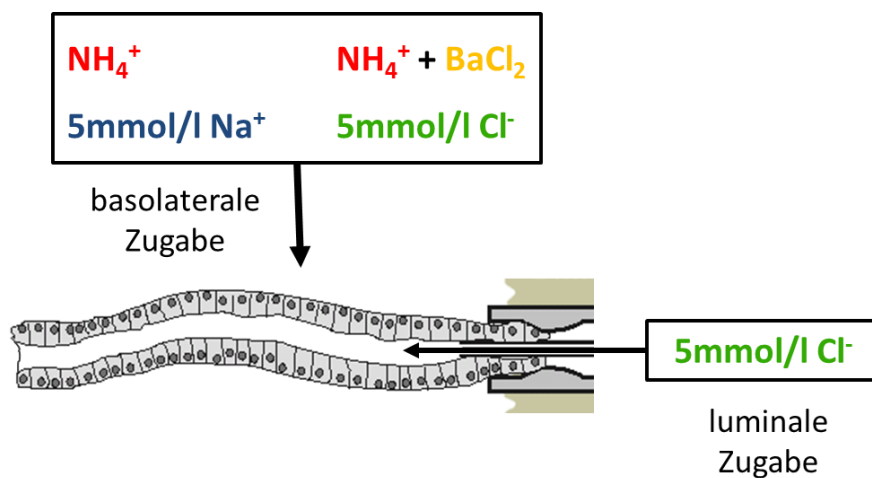


Abbildung 25: Perfusion isolierter Sammelrohre

Aufgezeigt ist die luminalen und basolateralen Belastung eines Tubulus mit verschiedenen Versuchslösungen

2.2.7.4 Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten beim pH-Umschlag

In der Auswertung der Versuche wurde zusätzlich zur statistischen Auswertung der Fluoreszenzquotienten und deren graphischer Auswertung jeweils beim Einwasch der Versuchslösung die Zeitkonstante Tau für die pH Änderung bestimmt. Dies geschah mit Hilfe der Software OriginPro 7.5G, indem die gemessenen Werte zunächst als Punktdiagramm gegen die Zeit dargestellt wurden (Abb. 27). Im Bereich der pH Änderung läßt sich der Fluoreszenzquotient mit einer Exponentialfunktion beschreiben. Die Meßwerte wurden durch eine entsprechende Näherungsfunktion beschrieben und aus dieser Funktion wurde dann der Wert von Tau ermittelt.

Ansäuerung: $F(t) = N \times e^{-\frac{t}{T}} + Y$ **Erholung:** $F(t) = N \times (1 - e^{-\frac{t}{T}}) + Y$

Abbildung 26: Exponentialfunktionen zur Beschreibung der Änderung des Fluoreszenzquotienten als Maß für die pH Änderung

$F(t)$ Fluoreszenzquotient zum Zeitpunkt t ; T Zeitkonstante Tau; N Effektgröße; t Zeit; Y Fluoreszenzquotient am Ende (Ansäuerung) bzw. Anfang (Erholung) des asymptotischen Kurvenverlaufs.

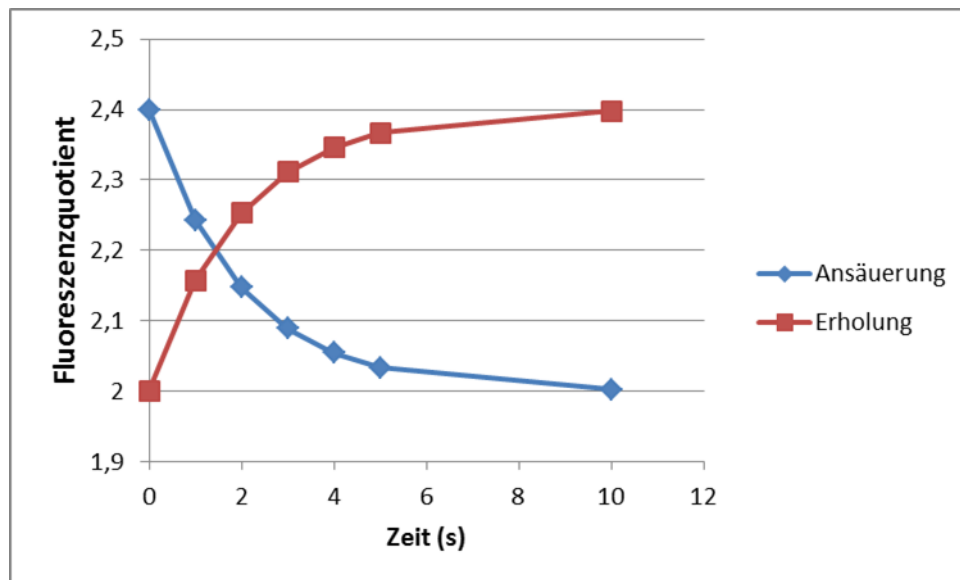


Abbildung 27: Näherungsfunktion durch Meßpunkte einer pH Änderung

Dargestellt als Fluoreszenzquotient gegen die Zeit. Blau: Ansäuerung von einem Ausgangsquotienten von 2,4. Rot: Erholung von der Ansäuerung, ausgehend von einem Quotienten von 2. Die Werte für die Parameter der Gleichungen (Abb. 26) sind in diesem Fall $T=2s$; $Y=2$; $N=0,4$.

2.2.7.5 Elektrische Messungen

Außer den Versuchen zur pH-Regulation führten wir zusätzlich, wann immer es die Qualität der Tubuli zuließ, elektrische Messungen an den Tubuli durch. Durch die oben beschriebene Methode zur Injektion eines Strompulses war es uns dann möglich, den äquivalenten Kurzschlußstrom (I_{sc}) über die Membran zu berechnen. Dieser wurde mit den Ergebnissen aus den Messungen an jungen Mäusen verglichen.

2.2.8 Analyse und statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 2003 und OriginPro 7.5G. In allen folgenden Graphen und Tabellen sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte und die zugehörige Standardabweichung (SEM) angegeben. Diese erscheint in den Graphen jeweils als Fehlerbalken. Mit n wird die jeweilige Anzahl an Versuchstieren aufgelistet. Es wurde zur Signifikanzprüfung ein ungepaarter, zweiseitiger Student-t-Test mit einem 95%-Konfidenzintervall verwandt. Die Mäuse wurden hierbei nicht nach Geschlechtern getrennt.

3 Ergebnisse

In den folgenden Abschnitten werden jeweils die Ergebnisse für unsere alten WT und KD, die ausnahmslos älter als 80 Wochen waren, vergleichend tabellarisch und graphisch dargestellt. Zum Teil werden diese Daten zusätzlich mit den metabolischen Daten junger Mäuse mit einem Alter von 10-16 Wochen, die aus einer Serie aus dem Frühjahr 2007 stammen. Es handelt sich dabei um Vergleichsdaten, die mir von Dr. Nina Himmerkus zur Verfügung gestellt worden sind. Die einzelnen Populationen sind wie folgt farblich kodiert:



Signifikante Unterschiede zwischen den alten Populationen sind mit einem * gekennzeichnet, auf Unterschiede zu den jungen Populationen an WT und KD wird in schriftlicher Form Stellung bezogen.

3.1 Metabolische Daten

3.1.1 Körpermaße

Beim Körpergewicht zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den KD und den Wildtypen ($p = 0,003$). Ebenso war bei der Messung der Körperlänge ein signifikanter Unterschied zwischen den Populationen ($p < 0,001$) festzustellen. Bei der Berechnung des BMI war zwischen den Populationen jedoch kein signifikanter Unterschied ($p = 0.37$) erkennbar.

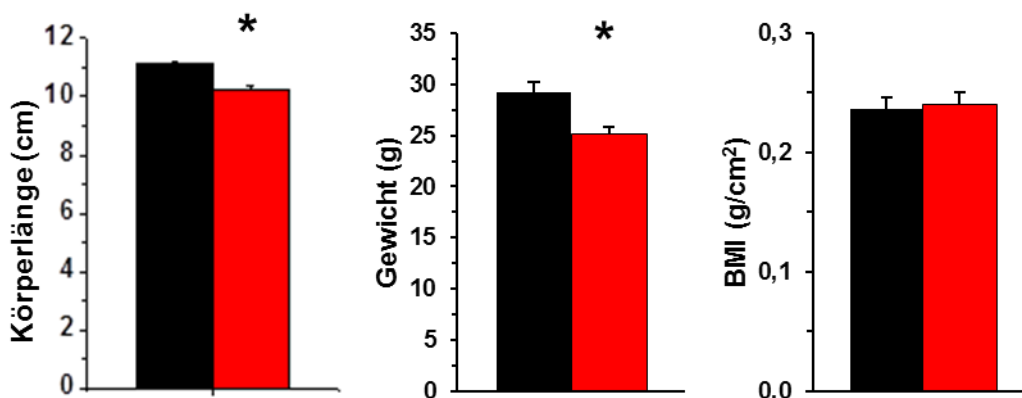


Abbildung 28: Gewichts- und Größenparameter der Versuchstiere
Aufgezeigt sind Körpergewicht, BMI und Körperlänge

In der Zusammenschau dieser Daten ist erkennbar, dass aufgrund des unveränderten BMI die KD insgesamt kleiner als die WT sind, jedoch nicht magerer.

3.1.2 Symptome der FHHNC-Erkrankung

3.1.2.1 Magnesiumparameter

Die KD wiesen eine Hypomagnesiämie auf ($p < 0.001$, siehe Abb. 29). Diese ging einher mit einer erhöhten fraktionellen Ausscheidung von Magnesium durch die Niere. Da das Filtrat der KD aufgrund der vorliegenden Hypomagnesiämie bereits weniger Magnesium enthielt, war die Urinausscheidung zwischen KD und WT nicht signifikant verschieden ($p = 0.359$).

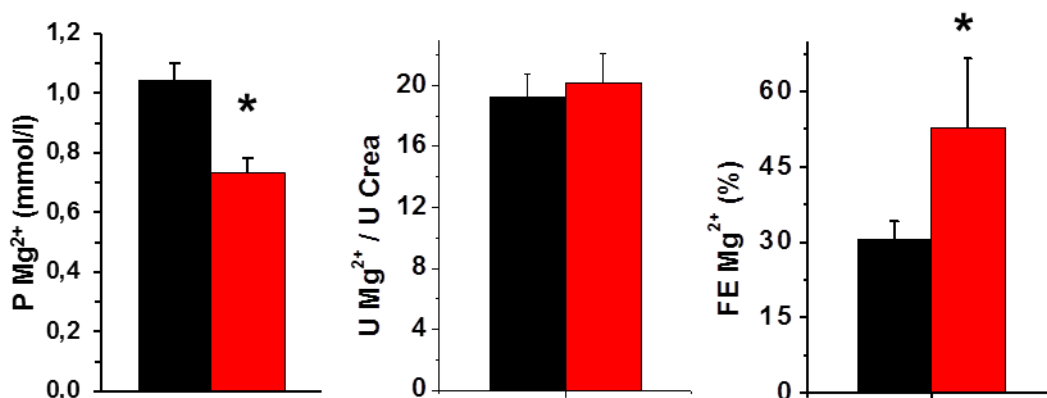


Abbildung 29: Magnesiumparameter
Abgebildet sind Plasma-Magnesiumkonzentration, Urin-Magnesiumkonzentration mit Bezug auf das Kreatinin sowie fraktionelle Magnesiumausscheidung.

Im Vergleich mit den jungen Versuchstieren ist die Hypomagnesiämie sogar stärker ausgeprägt ($P \text{ Mg}^{2+}$: $0.84 \pm 0.02 \text{ mmol/l}$ in WT und $0.69 \pm 0.02 \text{ mmol/l}$ in KD, $p < 0.001$), da die alten WT mit ihrer Plasmamagnesiumkonzentration anstiegen, die alten KD jedoch nicht.

3.1.2.2 Calciumparameter

Für die Calciumkonzentrationen im Plasma war kein signifikanter Unterschied zwischen den KD und den WT erkennbar ($p = 0.32$). Im Urin hingegen zeigten sich gemäß dem FHHNC-Phänotyp die deutlichsten Differenzen: So war hier die Konzentration bezogen auf das Kreatinin bei den KD mehr als siebenmal so hoch wie bei den WT ($p < 0.001$). Dies entspricht den Ergebnissen der jüngeren Vergleichstiere.

Bei der fraktionellen Exkretion war entsprechend zwischen den Populationen ein vergleichbarer Unterschied feststellbar ($p = 0.003$).

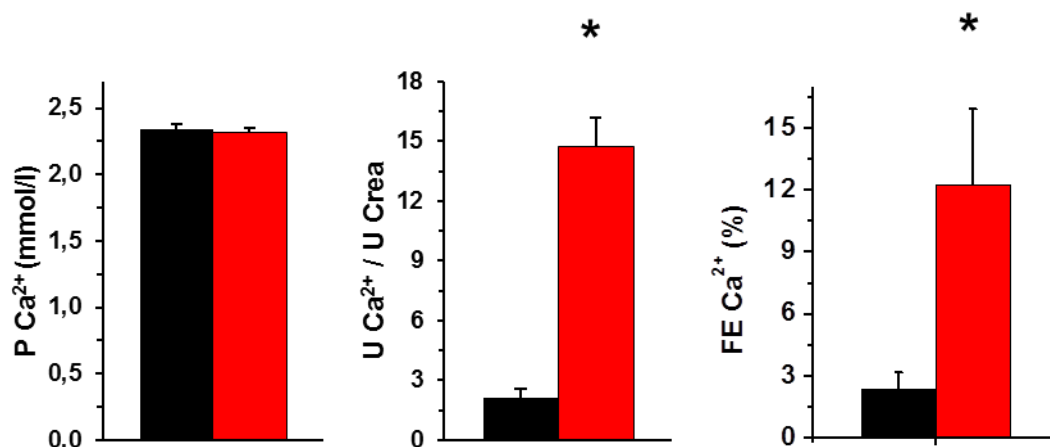


Abbildung 30: Calciumparameter

Abgebildet sind Plasma-Calciumkonzentration, Urin-Calciumkonzentration mit Bezug auf das Urinkreatinin sowie fraktionierte Calciumausscheidung.

Es zeigt sich also, dass die Hypercalciurie auch bei den alten KD noch immer deutlich vorhanden ist, diese jedoch anscheinend durch Kompensationsmechanismen in der Lage sind, ihre Plasmakonzentration an Calcium auf einem, dem der WT äquivalenten, Niveau zu halten. Auch für den Calciummetabolismus zeigten sich Änderungen mit dem Alter:

Bei den jüngeren Tieren war das $P \text{ Ca}^{2+}$ in den KD trotz Hypercalciurie überkompensiert und mit $2.43 \pm 0.02 \text{ mmol/l}$ im Vergleich zu den WT mit $2.35 \pm 0.01 \text{ mmol/l}$ leicht erhöht. Die tubuläre Calciumrückresorption nahm in beiden Gruppen mit dem Alter ab (FE Ca^{2+} : $0.421 \pm 0.06 \%$ in WT, $5.54 \pm 0.46 \%$ in KD).

3.1.2.3 Phosphatparameter

Das Phosphat war im Plasma bei den KD gegenüber den WT nicht signifikant erniedrigt ($p < 0.125$).

Bei der fraktionellen Exkretion war zwischen den Populationen kein signifikanter Unterschied feststellbar ($p = 0.169$), wobei auch hier ein Trend zur höheren Phosphatausscheidung bei den KD vorlag.

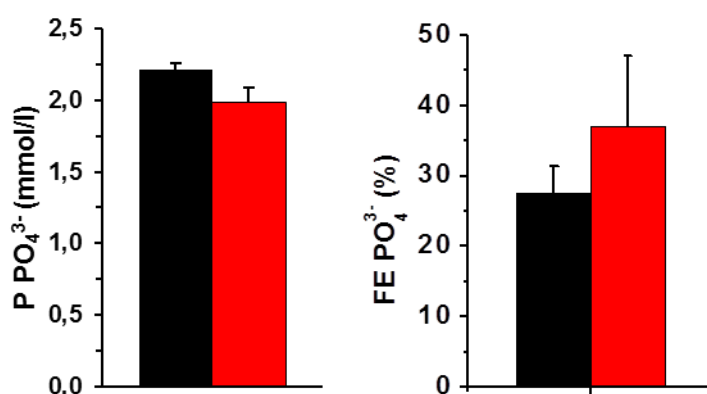


Abbildung 31: Phosphatparameter

Abgebildet sind Plasma-Phosphatkonzentration sowie fraktionelle Phosphatausscheidung.

Es lässt sich anhand der erhobenen Daten feststellen, dass es zu keiner exzessiv erhöhten Phosphatausscheidung und Mobilisierung kommt. Die Regulation von Calcium und Phosphat ist chemisch und hormonell eng verzahnt (siehe Abschnitt 1.4.2): Eine solche Phosphaturie wäre insbesondere ein starker Hinweis auf einen erhöhten Parathormonspiegel, da dieses die tubuläre Phosphatabsorption hemmt. Ebenso würde ein signifikant erhöhter Plasmaspiegel auf eine erhöhte Mobilisation von Calciumphosphat aus dem Knochen durch Demineralisation (ebenfalls durch Parathormon getriggert) hinweisen. Beides ist hier allerdings eindeutig nicht der Fall.

Bei den Jungtieren zeigte sich ein deutlicheres Bild. Hier war das Phosphat mit 2,29 mmol/l zu 2,98 mmol/l bei den KD deutlich erniedrigt und die FE Phosphat mit 19,6 % zu 7,3 % erhöht, jedoch auf niedrigerem Niveau.

3.1.2.4 Knochenparameter

Bei den gemessenen Knochenparametern konnten weder bei den Oberschenkeldurchmessern, noch bei der Gesamtlänge oder dem Gesamtgewicht ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

	WT		KD		p
n	8		9		
Durchmesser KG f/d (mm)	2,79	± 0,060	2,74	± 0,064	0,317
Durchmesser KG l/m (mm)	3,09	± 0,062	3,17	± 0,100	0,264
Gesamtlänge (mm)	16,16	± 0,19	16,17	± 0,14	0,493
Gewicht (mg)	63,58	± 3,79	59,63	± 1,56	0,166

Tabelle 1: Knochenparameter

Aufgeführt sind Durchmesser des Kniegelenkes von frontal nach dorsal (f/d) sowie von lateral nach medial (l/m), die Gesamtlänge und das Gesamtgewicht der Oberschenkelknochen.

Aufgrund des Calciumverlustes über den Urin kommt dem Knochenstoffwechsel eine besondere Bedeutung zu. Ein massiver Calciummangel oder eine vermehrte Mobilisierung von Calcium aus dem Knochen zur Aufrechterhaltung der Plasmacalciumkonzentration würden eine verminderte Knochendichte im Sinne einer Osteoporose oder eine Behinderung des Knochenwachstums nach sich ziehen. Für beides konnten wir anhand der erhobenen Daten keinen Hinweis finden. Mit Bezug auf das Körpergewicht (siehe 3.1.1) läßt sich festhalten, dass die KD bei normal ausgeprägten Knochen insgesamt zierlicher sind.

3.1.3 Salz und Wasserhaushalt

Aufgrund der beeinträchtigten Kationenselektivität in der TAL können Natrium- und Chloridionen dort entlang ihres Konzentrationsgradienten ins Lumen zurückdiffundieren (siehe 1.3.1). In den folgenden Abschnitten sind deshalb Parameter gegenübergestellt, die den Salz- und Volumenhaushalt der Tiere beleuchten.

3.1.3.1 Hämatokrit und Osmolalität

In der Plasmaosmolalität waren keine Unterschiede zwischen den Populationen erkennbar ($p = 0.499$). Bei der Urinosmolalität war eine signifikant höhere Konzentration an gelösten Ionen bei den KD nachweisbar ($p = 0.021$). Ebenso war beim Hämatokrit, der den Anteil der korpuskulären Elemente am Blut angibt, bei den KD ein signifikant erhöhter Wert nachweisbar ($p = 0.041$). Insgesamt waren die Hämatokritwerte gegenüber den Jungtieren deutlich niedriger.

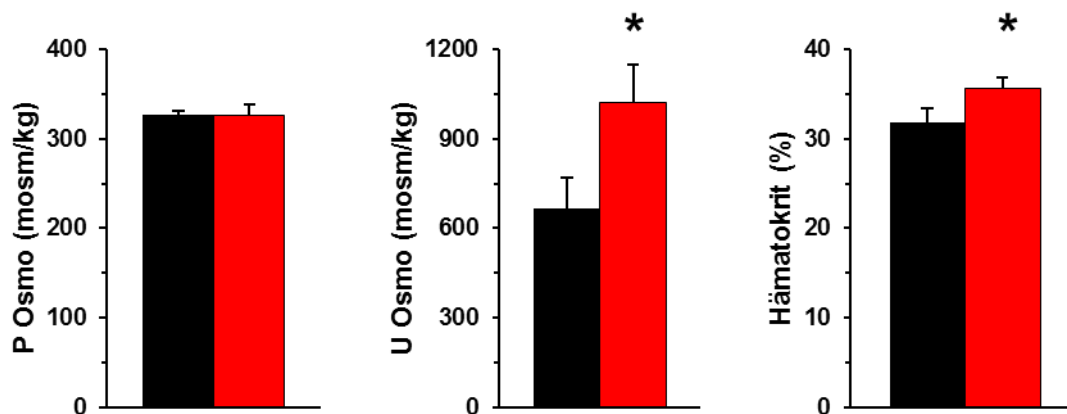


Abbildung 32: Hämatokrit und Osmolalitäten

Abgebildet sind die Urin- und Plasmaosmolalität sowie der Hämatokrit

3.1.3.2 Elektrolytkonzentrationen im Plasma

Bei den Plasmaelektrolyten waren für Natrium, Kalium und Chlorid keine signifikanten Unterschiede erkennbar, hier zeigten sich beide Populationen unter diesen Bedingungen ausgeglichen.

	WT	KD	p
n	19	14	
Plasma Na ⁺ (mmol/l)	159,37 ± 0,68	158,14 ± 1,00	0,1508
Plasma K ⁺ (mmol/l)	4,65 ± 0,19	4,55 ± 0,26	0,3769
Plasma Cl ⁻ (mmol/l)	109,16 ± 0,95	107,14 ± 1,39	0,1115

Tabelle 2: Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid

Bei den jüngeren Populationen waren die Konzentrationen von Natrium und Kalium jeweils sowohl bei den KD als auch WT signifikant niedriger (Natrium: 149.26 ± 0.43 mmol/l in WT zu 150.86 ± 0.42 mmol/l in KD, $p < 0.001$; Kalium: 4.10 ± 0.08 mmol/l in KD zu 3.99 ± 0.07 mmol/l in WT, $p = 0.013$).

3.1.3.3 Nierenfunktion

Als Nierenfunktionsparameter wurden die Plasmakonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff bestimmt. Allerdings war kein signifikanter Unterschied zwischen KD und WT

festzustellen, beide Werte waren aber im Vergleich mit den jungen Populationen deutlich angestiegen (Harnstoff: $p < 0.001$, Kreatinin: $p < 0.001$).

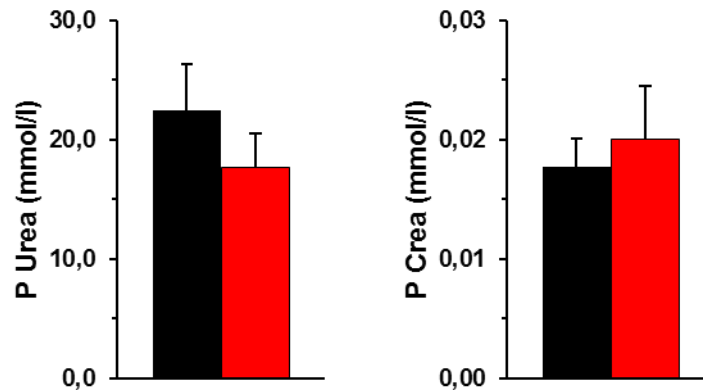


Abbildung 33: Plasmakonzentrationen von Harnstoff und Kreatinin
Abgebildet sind die Konzentrationen von Harnstoff und Kreatinin im Plasma

3.1.3.4 Tubuläre Parameter

3.1.3.4.1 Natrium, Kalium, Chlorid

Für die Natriumwerte ist festzustellen, dass das Verhältnis $U Na^+ / U Krea$ bei den KD im Vergleich zu den WT deutlich erniedrigt ist. Bei der fraktionellen Exkretion (FE) war zwischen den Populationen aufgrund der großen Streuung der Werte kein signifikanter Unterschied feststellbar, allerdings war auch hier ein Trend zu einer höheren Ausschöpfung der Natriumresorption bei den KD erkennbar. Im Vergleich mit den Jungtieren zeigten sich sowohl für das Verhältnis als auch für die FE deutlich gesteigerte Werte.

Für das Kalium war sowohl für das Verhältnis $U K^+ / U Krea$ als auch für die fraktionelle Exkretion kein signifikanter Unterschied zwischen KD und WT erkennbar. Im Vergleich mit den Jungtieren zeigten sich sowohl für das Verhältnis als auch für die FE deutlich gesteigerte Werte.

Beim Chlorid tendierten die KD ebenfalls zu einem niedrigeren Verhältnis von $U Cl^- / U Krea$. Bei der fraktionellen Exkretion war zwischen den Populationen kein signifikanter Unterschied feststellbar. Im Vergleich mit den Jungtieren zeigten sich sowohl für das Verhältnis als auch für die FE deutlich gesteigerte Werte.

Beim Quotienten aus der Natriumkonzentration und Kaliumkonzentration war dieser bei den KD gegenüber den WT signifikant erniedrigt, was bedeutet, dass im Verhältnis mehr Kalium als Natrium im Urin der KD ausgeschieden wird.

	WT		KD		p
n	19		14		
Urin Na⁺ (mmol/l) (alt)	141,5	± 14,9	96,7	± 15,3	0.025
FE Na⁺ (%) (alt)	1,84	± 0,35	1,43	± 0,51	0.251
Urin Na⁺ (mmol/l) (jung)	74,9	± 9,7	81,7	± 11	0,3257
FE Na⁺ (%) (jung)	0,33	± 0,05	0,46	± 0,09	0,1226
Urin K⁺ (mmol/l) (alt)	194,7	± 17,3	170,9	± 20,5	0.161
FE K⁺ (%) (alt)	79,73	± 13,27	79,54	± 22,55	0.497
Urin K⁺ (mmol/l) (jung)	162,4	± 28,5	132,2	± 10,5	0,1634
FE K⁺ (%) (jung)	24,84	± 4,14	26,72	± 2,68	0,3493
Urin Cl⁻ (mmol/l) (alt)	139,3	± 15	112,7	± 18,5	0.137
FE Cl⁻ (%) (alt)	2,70	± 0,57	2,48	± 0,89	0.414
Urin Cl⁻ (mmol/l) (jung)	83,7	± 9,5	94,5	± 9,9	0,2195
FE Cl⁻ (%) (jung)	0,53	± 0,08	0,78	± 0,11	0,0366
Urin Na⁺ / Urin K⁺ (alt)	0,75	± 0,05	0,56	± 0,042	0.005

Tabelle 3: Tubuläre Parameter für Natrium, Kalium und Chlorid im Vergleich mit den Jungtieren

3.1.4 Säure-Base-Haushalt

Im Plasma waren für die erhobenen Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und KD erkennbar.

	WT	KD	p
n	19	14	
PCO ₂ (mmHg)	50,93 ± 2,26	48,23 ± 2,39	0,2232
pH	7,32 ± 0,02	7,33 ± 0,03	0,3195
HCO ₃ A (mmol/l)	25,64 ± 1,25	24,89 ± 1,25	0,3483
BE (mmol/l)	-1,42 ± 1,35	-1,56 ± 1,73	0,4760

Tabelle 4: Säure-Base-Parameter im Plasma

Ebenso waren im Urin die HCO₃⁻-Konzentration wie auch der CO₂-Partialdruck bei KD und WT nicht signifikant unterschiedlich.

Überraschenderweise zeigte sich auch kein Unterschied mehr im Urin-pH, hier waren die Werte für die WT ähnlich niedrig wie bei den KD. Bei den jüngeren Mäusen war der Urin-pH der Kontrolltiere noch deutlich weniger sauer als der der KD (siehe Abb. 34).

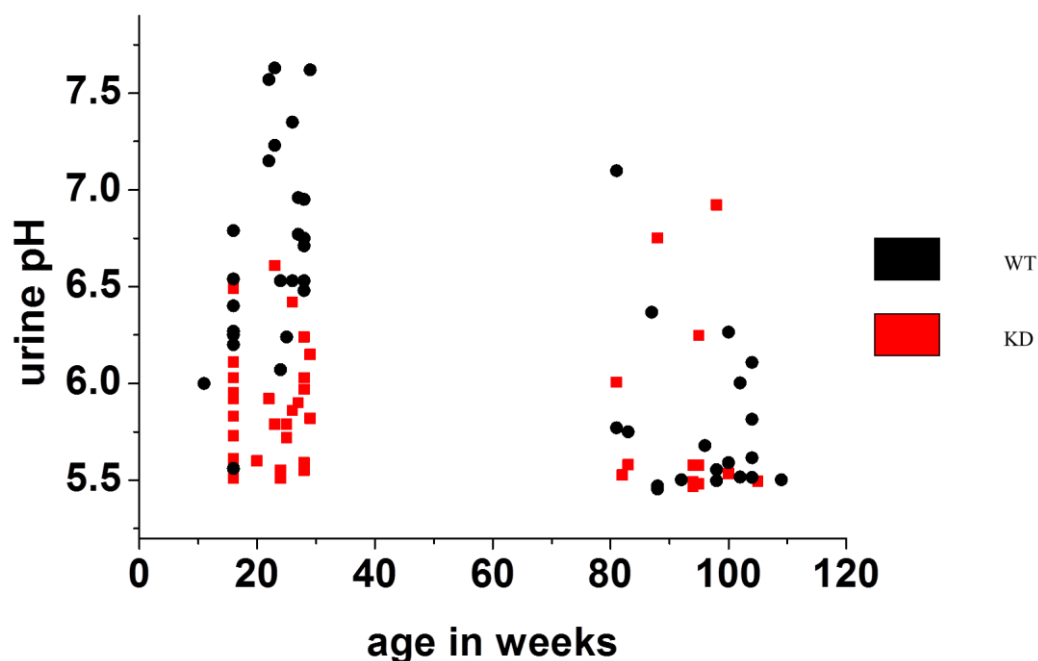


Abbildung 34: Altersverteilung der Urin-pH-Werte

Abgebildet sind die Urin-pH-Werte sowohl von alten als auch jungen KD und WT

3.2 Mikroskopische Morphologie und Expression von Transportproteinen

3.2.1 Tubulusemorphologie

Insgesamt wiesen die distalen Nephronen der alten Mäuse deutliche Zeichen von Atrophie oder Hypertrophie auf. Vor allem das distale Konvolut fiel durch aufgetriebene Zellen und starke Gewundenheit auf (siehe Abb. 35). Es zeigte sich auch, dass diese morphologischen Veränderungen beide Populationen betrafen. Da es uns nicht möglich war, dies zu quantifizieren, haben wir diese Phänomene nur fotodokumentiert.

Bei den kortikalen Sammelrohren mit ihren Verzweigungen waren Kalibersprünge zu sehen. Die Sammelrohre zeigten z.T. nicht das typische Kopfsteinpflastermuster sondern Abschnitte mit uniformen, glatten Aspekten.

Auch an den Schnittpräparaten zeigte sich das Alter der Tiere. Die vorhandenen Glomeruli zeigten deutlich größere Durchmesser und das Verhältnis Interstitium zu Nephron war im Vergleich zu den jungen Mäusen (beides hier nicht gezeigt) deutlich zugunsten des Interstitiums verschoben.

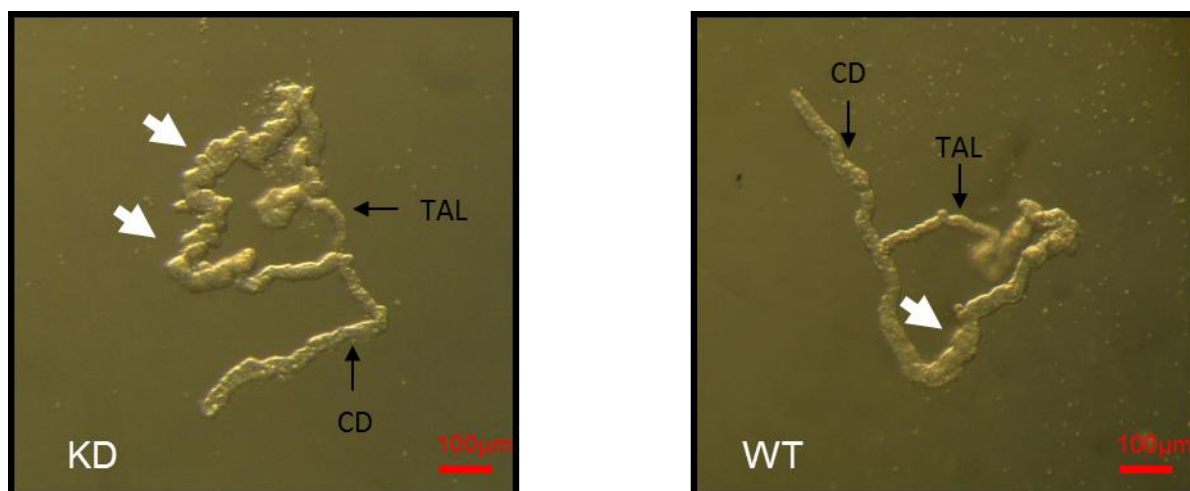


Abbildung 35: Makroskopische Morphologie

Die Abbildungen zeigen jeweils auffällige Bereiche (weißer Pfeil) im DCT für KD und WT.

3.2.2 Subzelluläre Lokalisation und Proteinmenge der Transportproteine

3.2.2.1 Säure-Base-Transporter im kortikalen Tubulus

Für das Sammelrohr fiel insbesondere in den kortikalen Anteilen der Tubuli auf, dass nicht ein Verhältnis Haupt- zu Schaltzellen von 2:1 wie in jungen Mäusen vorlag. In unseren Präparaten waren die Schaltzellen in vielen Abschnitten deutlich häufiger vertreten, was allerdings auf beide Populationen zutraf. Einige Abschnitte wirkten geradezu mit Schaltzellen gepflastert (siehe Abb. 36). Eine genaue Quantifizierung Hauptzellen gegen Schaltzellen wurde nicht vorgenommen.

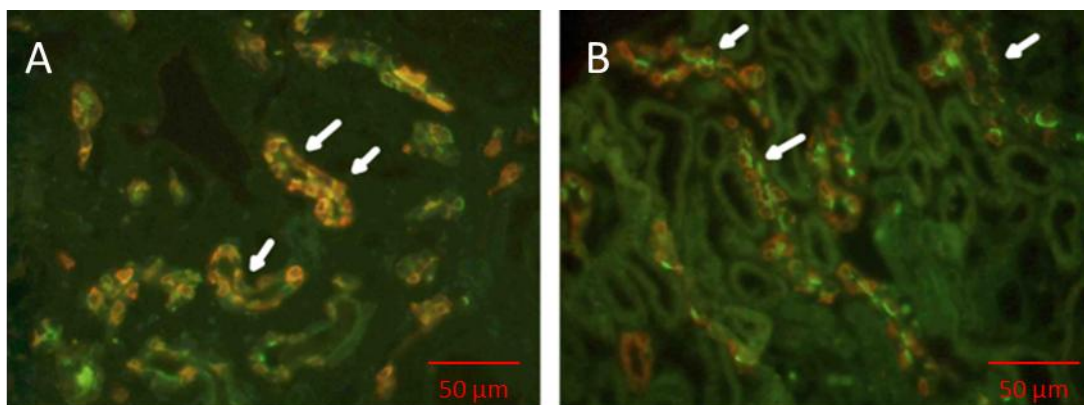


Abbildung 36: Mikroskopische Tubulussmorphologie

Bildabschnitt A: Färbungen für vH^+ -ATPase (grün) und Carboanhydrase II (rot)

Bildabschnitt B Färbungen für Pendrin (grün) und Carboanhydrase II (rot)

Man beachte vor allem die Anzahl an Carboanhydrase-positiven Zellen, die der Anzahl der Schaltzellen entspricht. Besonders auffällige Segmente sind mit weißen Pfeilen markiert.

Für den Anionentauscher Pendrin, der sich in der luminalen Membran der B-Typ-Schaltzelle befindet und dort Bicarbonat im Austausch gegen Chloridionen sezerniert, zeigte sich bei den KD in den isolierten kortikalen Sammelrohren ein deutlich erhöhter Einbau in die Membran. So war hier das Verhältnis aus den Intensitäten des letzten 1 μ m zu den letzten 5 μ m ab luminal signifikant höher als in den WT ($p < 0.001$).

In den Kryoschnitten ließen sich die Ergebnisse aus den isolierten Tubuli reproduzieren. So war auch hier der Membranbesatz mit dem Transporter in den KD signifikant erhöht im Vergleich zu den WT ($p < 0.001$).

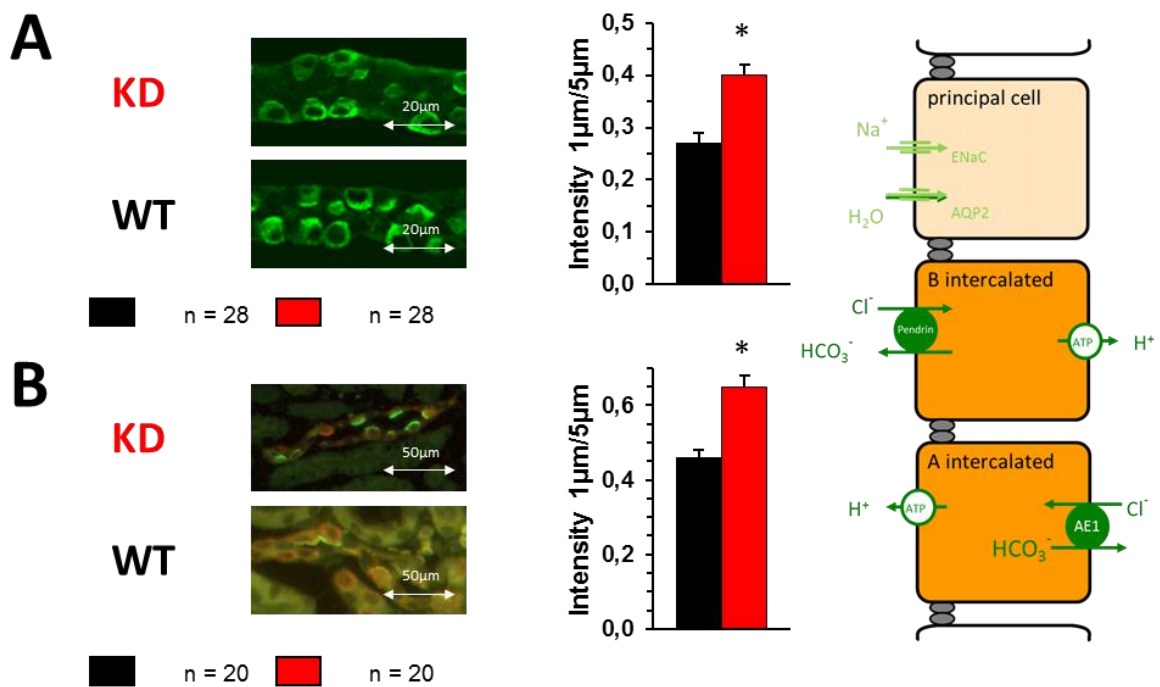


Abbildung 37: Pendrin in isolierten Tubuli und in Kryoschnitten

Auf der linken Bildseite sind jeweils für die isolierten Tubuli (Bildteil A) und darunter für die Kryoschnitte (Bildteil B) zwei Ausschnitte je für KD und WT dargestellt. Pendrin ist in allen Ausschnitten jeweils in grün angefärbt, in den Kryoschnitten ist zusätzlich die Carboanhydrase II in rot gefärbt.

In der rechten Bildhälfte ist graphisch das ermittelte Verhältnis der Intensitäten dargestellt, daneben findet sich ein Schema, das die Funktion der hier angefärbten Transporter aufzeigt.

In frisch isolierten kortikalen Sammelrohren wurden vornehmlich B-Typ- oder Non-A-Non-B-Schaltzellen mit basolateraler Lokalisation der vH⁺-ATPase angetroffen und mit dem Antikörper angefärbt und anschließend beurteilt. In diesen war der Einbau in die Membran in KD mit einem Verhältnis der Intensitäten signifikant höher als in den WT ($p < 0.001$).

In den Kryoschnitten ließen sich die A-Typ-Schaltzellen mit luminaler Lokalisation der vH⁺-ATPase besser anfärben und beurteilen. In den kortikalen Anschnitten ließ sich kein Unterschied im Membraneinbau der vH⁺-ATPase zwischen KD und WT erkennen ($p = 0.11$).

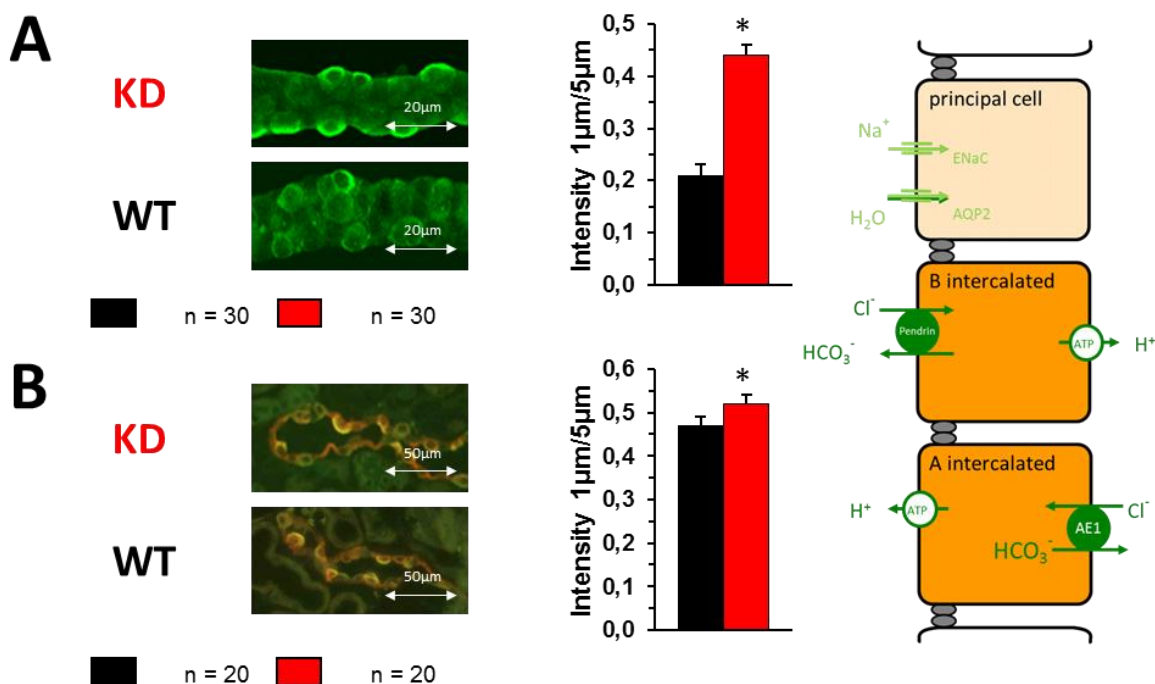


Abbildung 38: vH⁺-ATPase in isolierten Tubuli und in Kryoschnitten

Auf der linken Bildseite sind jeweils für die isolierten Tubuli (Bildteil A) und darunter für die Kryoschnitte (Bildteil B) zwei Ausschnitte je für KD und WT dargestellt. Die vH⁺-ATPase ist in allen Ausschnitten jeweils in grün angefärbt, in den Kryoschnitten ist zusätzlich die Carboanhydrase II in rot gefärbt.

In der rechten Bildhälfte ist graphisch das ermittelte Verhältnis der Intensitäten dargestellt, daneben findet sich ein Schema, das die Funktion der hier angefärbten Transporter aufzeigt.

Für die Gesamtproteinmenge an Pendrin zeigte sich auch im Westernblot eine signifikant höhere Expression in den KD ($p = 0.029$).

Bei den Proteinmenge der vH⁺-ATPase in den kortikalen Abschnitten zeigte sich, dass hier in den KD im Vergleich zu den WT die Expression deutlich vermindert war. So war die relative Intensität hier mit 0.78 ± 0.10 Einheiten mehr als doppelt geringer als in den WT mit 1.7 ± 0.35 Einheiten ($p = 0.03$).

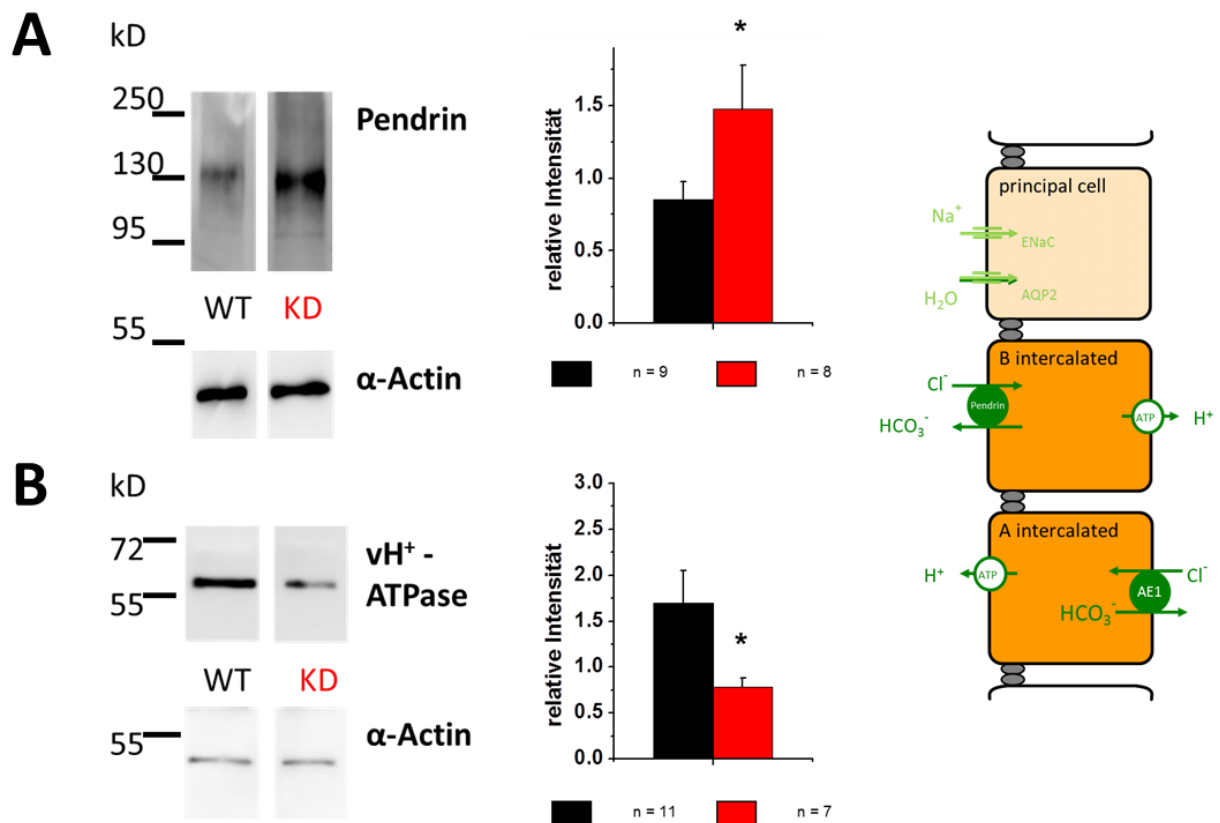


Abbildung 39: Westernblot und Gesamtproteinmenge für Pendrin und vH⁺-ATPase

Diese Abbildung zeigt beispielhaft das Ergebnis eines Westernblots für den Anionenaustauscher Pendrin (Bildteil A) sowie für die vH⁺-ATPase (Bildteil B). Auf der linken Bildseite ist der Größenstandard für Proteine in kDa zu sehen, der die Zuordnung der Proteine aufgrund ihrer Größe ermöglicht. Daneben finden sich die Banden für jeweils eine Probe von KD und WT. Darunter befinden sich die jeweils zugehörigen Proben für das Haushaltsprotein Alpha-Actin. Der rechnerische Bezug auf das Actin macht die Proben dann untereinander vergleichbar. Auf der Rechten Bildseite sind die Gesamtproteinmengen der beiden Transporter als Graphen aufgetragen.

Für den AE1, der in den A-Typ-Schaltzellen in der basolateralen Membran Bicarbonat im Austausch gegen Chlorid sezerniert, konnte in den isolierten kortikalen Sammelrohren zwischen den Populationen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0.13$).

Für den AE1 zeigte sich in den Kryoschnitten ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Membraneinbau zwischen KD und WT ($p = 0.193$).

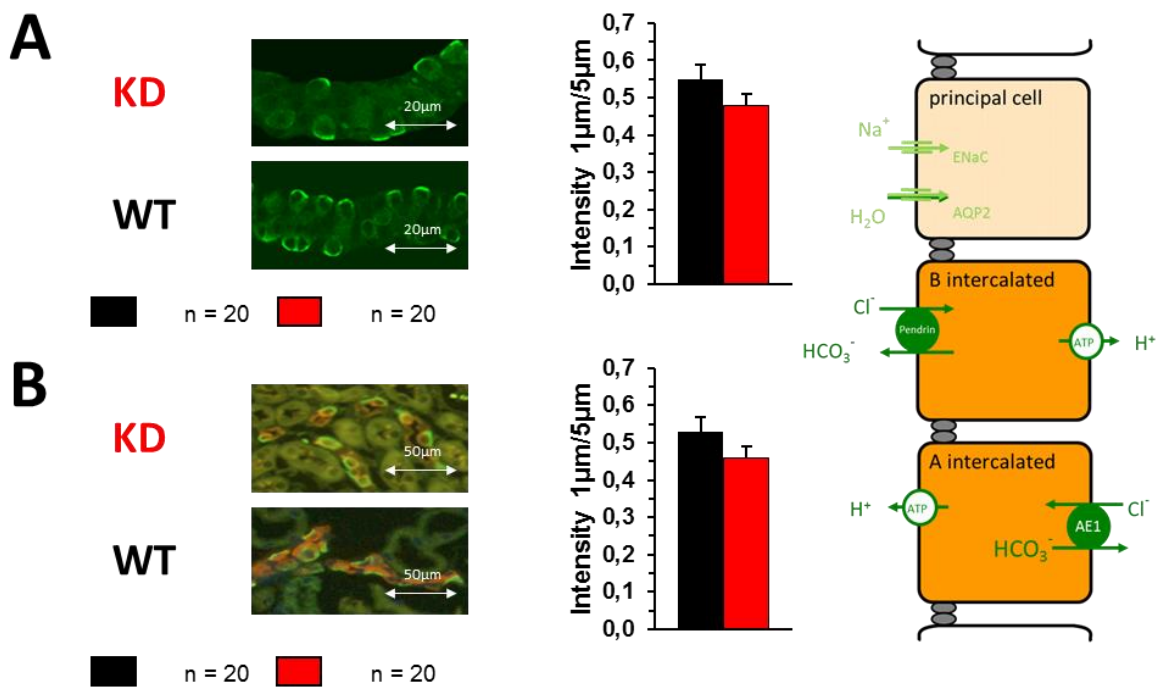


Abbildung 40: AE1 in isolierten Tubuli und in Kryoschnitten

Auf der linken Bildseite sind jeweils für die isolierten Tubuli (Bildteil A) und darunter für die Kryoschnitte (Bildteil B) zwei Ausschnitte je für KD und WT dargestellt. Der AE1 ist in allen Ausschnitten jeweils in grün angefärbt, in den Kryoschnitten ist zusätzlich die Carboanhydrase II in rot gefärbt.

In der rechten Bildhälfte ist graphisch das ermittelte Verhältnis der Intensitäten dargestellt, daneben findet sich ein Schema, das die Funktion der hier angefärbten Transporter aufzeigt.

Für den AE1 ließ sich bei der Gesamtproteinmenge kein signifikanter Unterschied zwischen KD mit 0.70 ± 0.05 und den WT mit 2.09 ± 0.89 ($p = 0.162$) feststellen. Allerdings zeigte sich ein Trend zu verminderter Expression in den KD.

3.2.2.2 Säure-Base-Transporter im medullären Sammelrohr

Im medullären Sammelrohr fanden sich in den Kryoschnitten für das Pendrin sowie für den AE1 nur eine geringe Expression und keine augenscheinliche Unterschiede in der Expression, sodass hier keine weitere Quantifizierung vorgenommen wurde.

Die vH⁺-ATPase ließ sich im Mark primär luminal anfärben, es zeigte sich ein den Befunden im Cortex entgegengesetztes Verhältnis. So war hier in den KD deutlich mehr vH⁺-ATPase in die Membran eingebaut als in den WT ($p < 0.001$).

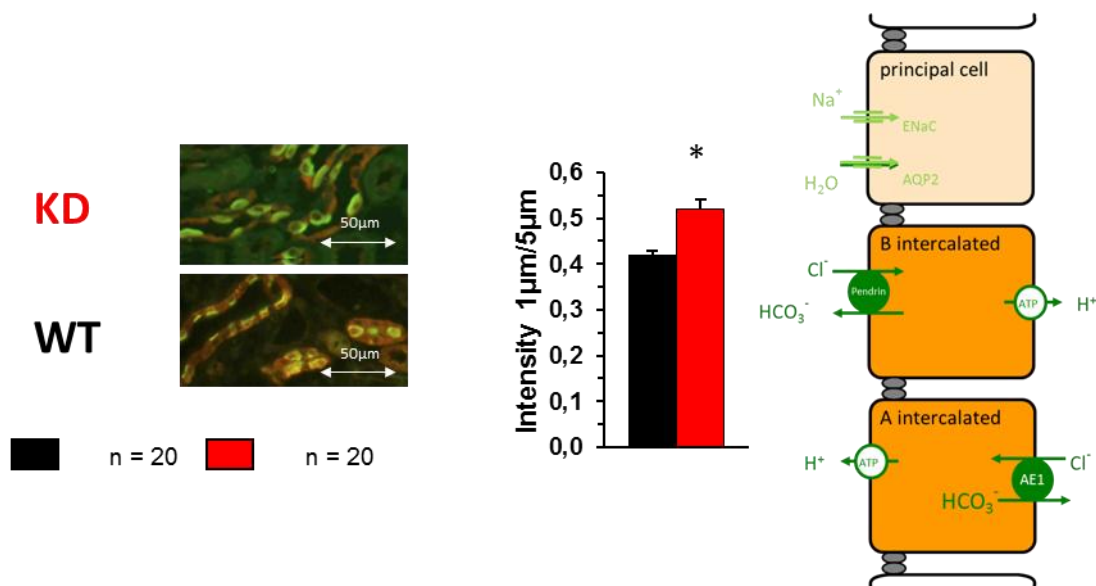


Abbildung 41: vH^+ -ATPase in medullären Kryoschnitten

Auf der linken Bildseite sind zwei Ausschnitte je für KD und WT dargestellt. Die vH^+ -ATPase ist jeweils in grün angefärbt, die Carboanhydrase II ist in rot gefärbt.

In der rechten Bildhälfte ist graphisch das ermittelte Verhältnis der Intensitäten dargestellt, daneben findet sich ein Schema, das die Funktion der hier angefärbten Transporter aufzeigt.

3.2.2.3 Salz- und Wassertransporter im Sammelrohr

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede für den in der luminalen Membran der Hauptzellen exprimierten β -ENaC in den isolierten Tubuli finden ($p = 0.49$). Insgesamt befand sich in den kollabierten Tubuli wenig β -ENaC in der luminalen Membran.

Dieses Ergebnis ließ sich in den Kryoschnitten bei ebenso geringer Lokalisation in der luminalen Membran reproduzieren, so war auch hier kein signifikanter Unterschied im Verhältnis der Intensitäten zu erkennen ($p = 0.112$).

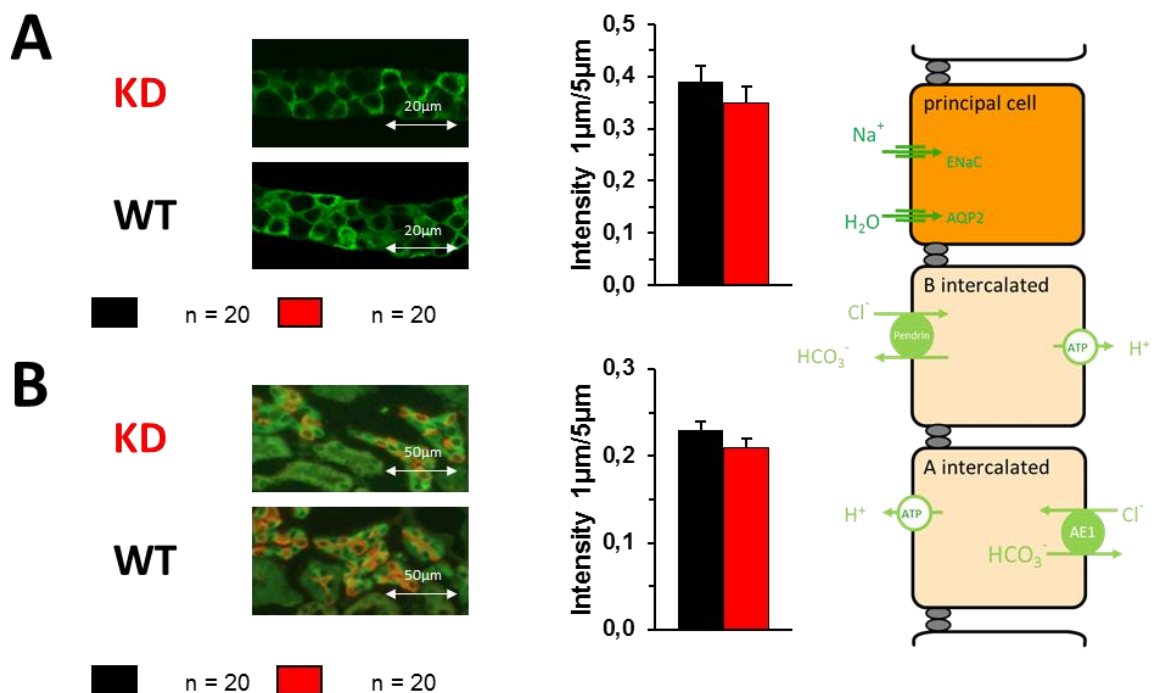


Abbildung 42: β-ENaC in isolierten Tubuli und in Kryoschnitten

Auf der linken Bildseite sind jeweils für die isolierten Tubuli (Bildteil A) und darunter für die Kryoschnitte (Bildteil B) zwei Ausschnitte je für KD und WT dargestellt. Der β-ENaC ist in allen Ausschnitten jeweils in grün angefärbt, in den Kryoschnitten ist zusätzlich die Carboanhydrase II in rot gefärbt.

In der rechten Bildhälfte ist graphisch das ermittelte Verhältnis der Intensitäten dargestellt, daneben findet sich ein Schema, das die Funktion der hier angefärbten Transporter aufzeigt.

Die AQP2-Färbungen ließen sich aufgrund der Verteilung der Färbungen in den isolierten Tubuli nicht suffizient auswerten, da hier vor allem der luminaire Bereich nur unzureichend von den Antikörpern erreicht wurde. Bei der rein fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung ließ sich kein Unterschied erkennen.

Im Gegensatz dazu ließ sich AQP2 in den Kryoschnitten sehr gut anfärben und auswerten. Es zeigte sich in der Verteilung kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Populationen, es war allerdings ein Trend zu vermehrtem Einbau in den KD gegenüber den WT ($p = 0.063$) zu erkennen.

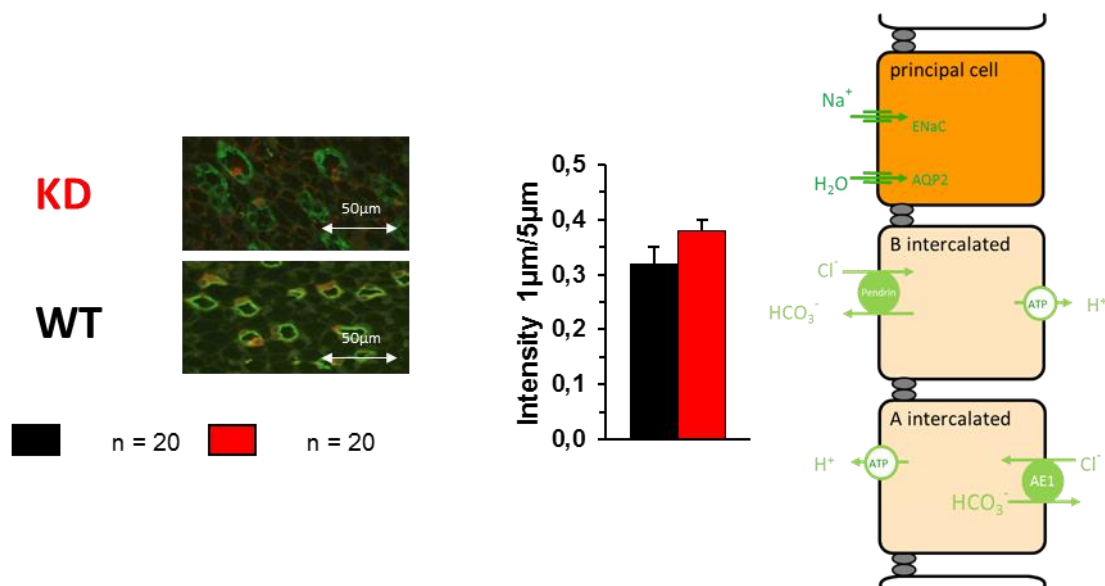


Abbildung 43: AQP2 in Kryoschnitten

Auf der linken Bildseite sind zwei Ausschnitte je für KD und WT dargestellt. AQP2 ist jeweils in grün angefärbt, die Carboanhydrase II ist in rot gefärbt.

In der rechten Bildhälfte ist graphisch das ermittelte Verhältnis der Intensitäten dargestellt, daneben findet sich ein Schema, das die Funktion der hier angefärbten Transporter aufzeigt.

3.2.2.4 Befunde im DCT

Im DCT konnten wir die vH⁺-ATPase ebenfalls luminal nachweisen. Die quantitative Verteilung diese ließ sich allerdings am vorhandenen Material mit unserer Methode nicht spezifisch für den DCT auswerten.

In den Kryoschnitten ließ sich zusätzlich der luminal Ca²⁺-Kanal TRPV5 anfärben und auswerten. Hier zeigte sich ein signifikant vermehrter Membraneinbau in den KD gegenüber den WT mit ($p < 0.001$).

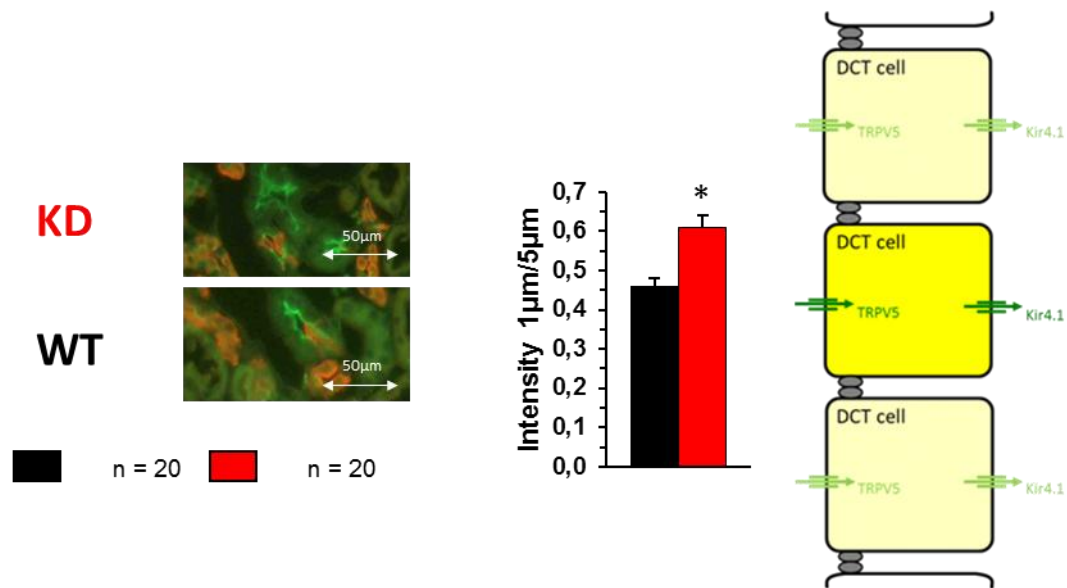


Abbildung 44: TRPV5 in Kryoschnitten

Auf der linken Bildseite sind zwei Ausschnitte je für KD und WT dargestellt. TRPV5 ist jeweils in grün angefärbt, die Carboanhydrase II ist in rot gefärbt.

In der rechten Bildhälfte ist graphisch das ermittelte Verhältnis der Intensitäten dargestellt, daneben findet sich ein Schema, das die Funktion der hier angefärbten Transporter aufzeigt.

3.2.2.5 Salztransport in der TAL

Für den in der TAL befindlichen luminalen Transporter NKCC2 zeigte sich, dass in den KD signifikant mehr Transportprotein in die Membran eingebaut war als in den WT ($p < 0.001$).

In den Kryoschnitten der TAL war ebenfalls ein erhöhter Einbau von NKCC2 in die luminalen Membranen bei den KD gegenüber den WT ($p = 0.032$) nachweisbar.

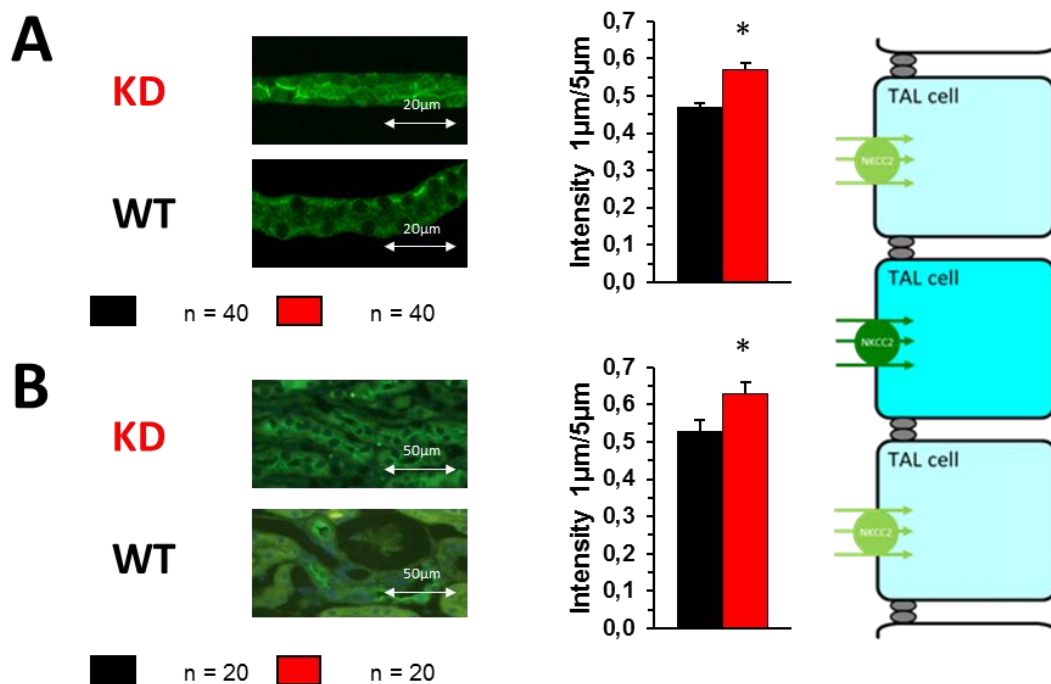


Abbildung 45: NKCC2 in isolierten Tubuli und in Kryoschnitten

Auf der linken Bildseite sind zwei Ausschnitte je für KD und WT dargestellt. NKCC2 ist jeweils in grün angefärbt. In der rechten Bildhälfte ist graphisch das ermittelte Verhältnis der Intensitäten dargestellt, daneben findet sich ein Schema, das die Funktion der hier angefärbten Transporter aufzeigt.

3.3 Ex vivo Untersuchungen an isolierten kortikalen Sammelrohren

Für den Säure-Base-Transport ergaben sich Hinweise auf eine Veränderung der Transporterausstattung (insbesondere für die vH^+ -ATPase und Pendrin) zwischen den KD und den WT. Wir führten daher Messungen der intrazellulären pH-Homöostase in frisch isolierten kortikalen Sammelrohren durch.

3.3.1 $[pH]_i$ -Verhalten unter extrazellulärer Belastung mit Ammonium

NH_3/NH_4^+ liegen in wässriger Lösung nebeneinander vor. Während NH_3 biologische Membranen direkt passieren kann, gelangt NH_4^+ anstelle von K^+ durch Kanäle oder Transporter in die Zelle (siehe Abb. 46A). Dies führt nach Gabe von NH_3/NH_4^+ zu charakteristischen $[pH]_i$ -Änderungen, die vor und nach Auswasch entsprechend von der Zelle entsprechend kompensiert werden. Frisch isolierte und perfundierte kortikale Sammelrohre

wurden auf ihre $[pH]_i$ -Änderungen hin untersucht, die durch eine vorübergehende Gabe von 20 mM NH_4^+/NH_3 bewirkt wurde.

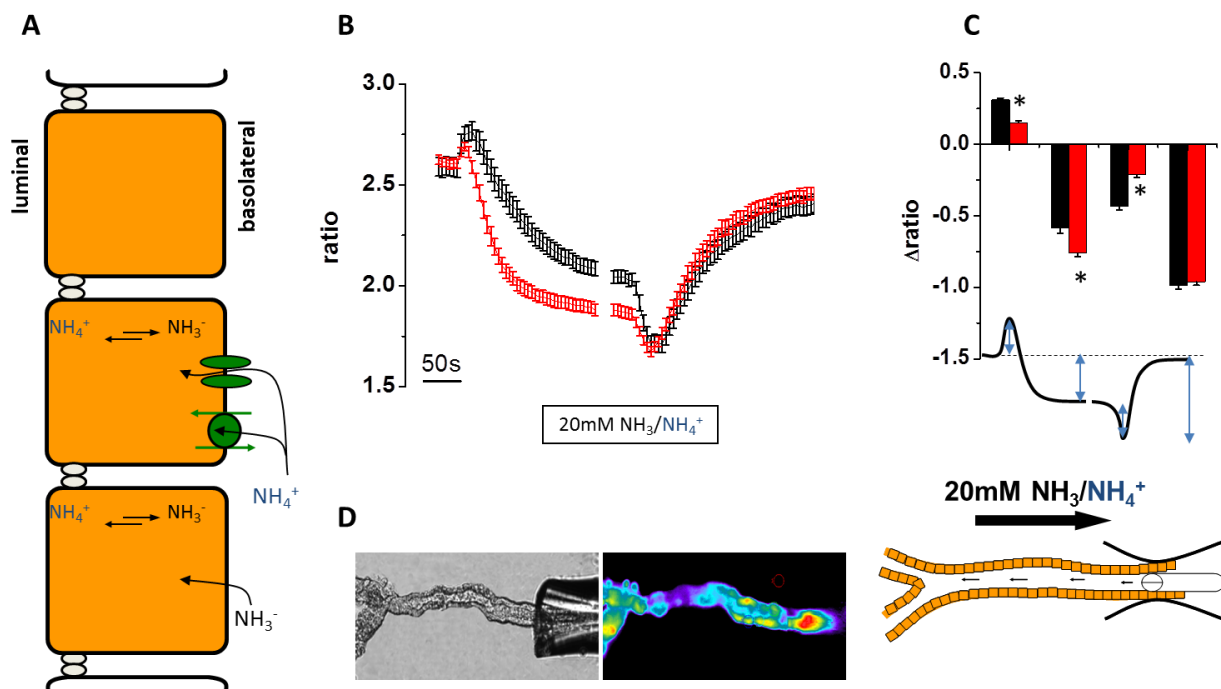


Abbildung 46: $[pH]_i$ unter extrazellulärer Belastung mit Ammonium

A: In diesem Bildbereich sind schematisch ein Tubulusepithel und potentielle Zutrittswege für NH_3/NH_4^+ in die Zelle dargestellt

B: Mittelwerte der Originalmessungen von Fluoreszenzquotienten im Zeitverlauf für KD (rot) und WT (schwarz). Die Zellen werden in Anwesenheit von NH_3/NH_4^+ azidiert. Nach Auswaschen von NH_3/NH_4^+ kann die Zelle den ursprünglichen Wert wiederherstellen.

C: Säulendiagramm der $[pH]_i$ -Änderungen zu den angegebenen Zeitpunkten im Experiment ($\Delta ratio$).

D: Transmissions- und Fluoreszenzbild mit Schemazeichnung eines isoliert perfundierten kortikalen Sammelrohres.

In diesem Versuch wurden jeweils 42 Zellen (z) von 14 bzw. 12 Tubuli (t) von jeweils 4 Mäusen (m) an KD und WT verwendet. (WT: $m = 4, t = 14, z = 42$; KD: $m = 4, t = 12, z = 42$)

Bei der Gabe eines basolateralen Ammoniumpulses zeigte sich, dass die KD beim Einwasch zunächst weniger stark alkalisieren als die WT, dann im Verlauf aber zum einen signifikant stärker und vor allem auch schneller azidifizieren als die WT (siehe Abb. 46B).

Für die Zeitkonstante Tau bei der initialen Azidifizierung zeigte sich dann auch folgerichtig bei den KD mit 29 ± 1 ein deutlich niedrigerer Wert als für die WT mit 53 ± 6 ($p < 0.001$). Auch war die Alkalisierungphase am Anfang des Pulses kürzer und weniger ausgeprägt.

Bei Auswasch, sprich Umschalten auf Kontrolllösung, war zu sehen, dass die Zellen zunächst noch stärker azidifizieren, wobei hier die WT ebenfalls auf das Niveau der KD absanken.

Anschließend wiesen beide Populationen von Tubuli eine ähnliche, langsame Regeneration des Ausgangs-pH-Wertes auf.

Beim Auswasch war mit einem Tau (Für die Alkalisierung, um den $[pH]_i$ wiederherzustellen) von 40 ± 5 bei den KD und mit 35 ± 4 bei den WT ($p = 0.464$) kein signifikanter Unterschied erkennbar.

Die Reaktion läßt insgesamt auf einen unterschiedlich stark ausgeprägten NH_4^+ -Einstrommechanismus schließen.

Da Kaliumkanäle hierfür verantwortlich sein könnten, setzten wir daher Barium als einen effektiven Blocker der Kaliumkanäle im Sammelrohr ein.

Wie in Abb. 47 zu sehen, hebt die gleichzeitige Anwesenheit von 5 mM Bariumchlorid den im vorherigen Experiment gemessenen Unterschied auf. Das Signal ist unter diesen Bedingungen mehr durch die NH_3 -Diffusion dominiert, d.h. die initiale Alkalisierung ist ausgeprägter und die Azidifizierung attenuiert, wenn auch nicht ganz aufgehoben. Die Zellen der KD konnten unter diesen Bedingungen schneller regulieren als die der WT. Für die Geschwindigkeitskonstante ergab sich beim Auswasch ein Wert von 57 ± 8 bei den WT und von 35 ± 5 bei den KD. Nach 5 Minuten Auswasch bestand immer noch ein leichter Unterschied.

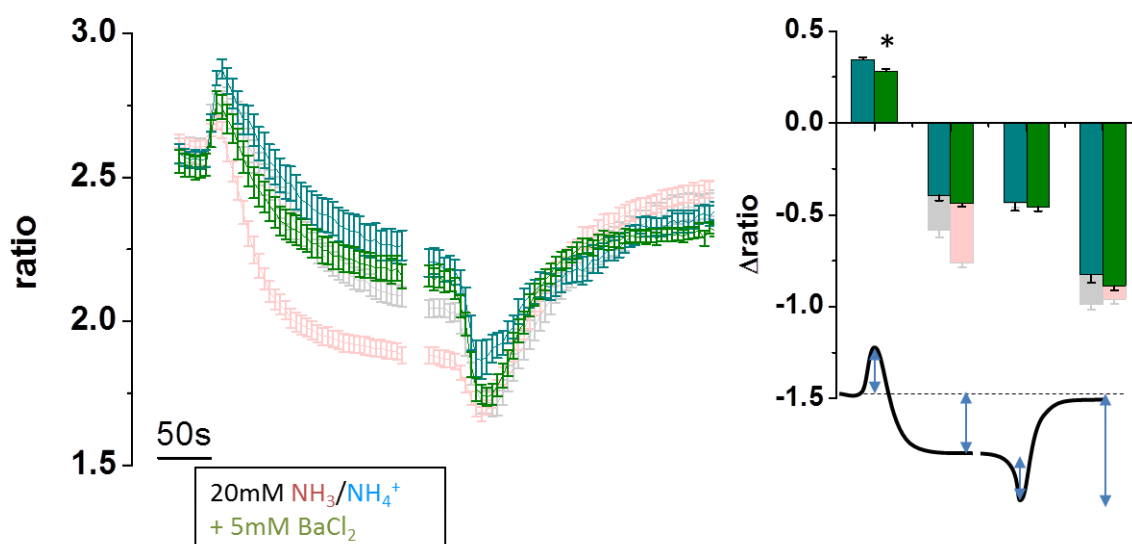


Abbildung 47: $[pH]_i$ unter extrazellulärer Belastung mit Ammonium unter Zugabe von Bariumchlorid

Abgebildet sind der Fluoreszenzquotient sowie der Δ Fluoreszenzquotient (KD in grün, WT in blau), leicht durchscheinend sind vergleichend die Werte des Versuchs ohne Bariumchlorid erkennbar. (WT: $m = 4$, $t = 7$, $z = 21$; KD: $m = 3$, $t = 9$, $z = 27$)

3.3.2 Natriumabhängige $[pH]_i$ -Regulation

Zweck dieses Experimentes war es, herauszufinden, inwiefern an der pH-Regulation natriumabhängige Transportprozesse beteiligt sind, wie z.B. der NHE oder Natrium-Bicarbonat-Transporter.

Dieser Versuch wurde im Anschluß an die Ammoniumpulsversuche durchgeführt. Deshalb sind die Startwerte unterschiedlich (siehe 3.3.1). Trotzdem wurden beide Versuche ausgewertet und in Abb. 48 als Quotient (links) und normalisiert auf den Startwert vor Gabe von 5 mM Natrium-Lösung dargestellt.

Sowohl KD wie auch WT säuerten bei verminderter extrazellulärer Natriumkonzentration intrazellulär langsam an, wobei in der Kinetik keine Unterschiede zu erkennen waren. Es ergab sich eine maximale Ansäuerung bei den WT von $-0,54 \pm 0,05$ und bei den KD von $-0,55 \pm 0,02$. Für die Geschwindigkeitskonstanten ergab sich für die initiale Azidifizierung bei den KD ein Wert von 33 ± 2 und für die WT ein Wert von 38 ± 3 ($p = 0.141$).

Bei Auswasch der niedrigen Natriumkonzentration, d.h. als die natriumabhängigen Transportprozesse wieder anliefen, zeigte sich, dass die KD deutlich schneller wieder ihren Ausgangswert erreichten, wohingegen die WT deutlich länger brauchten und erst langsam wieder mit ihrem Quotienten anstiegen. Die Zellen der KD konnten die Säurebelastung somit signifikant schneller ausgleichen. Die Zeitkonstanten ergaben entsprechend der schnelleren Erholung für die KD ein Wert von 20 ± 2 und für die WT 39 ± 5 ($p < 0.001$).

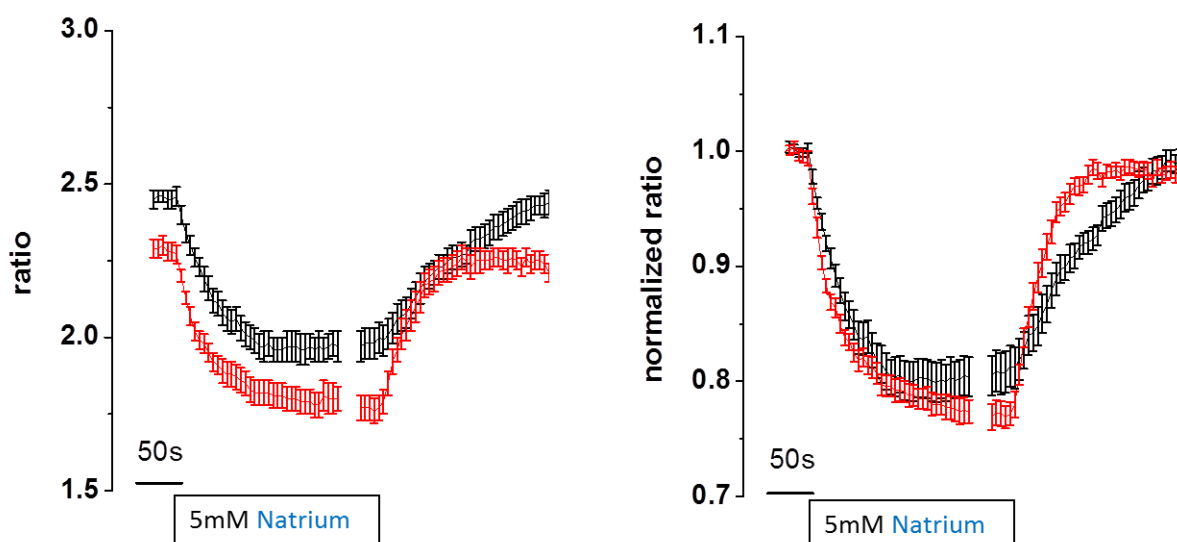


Abbildung 48: Natriumabhängige $[pH]_i$ -Regulation

In der linken Bildhälfte findet sich die Darstellung des Fluoreszenzquotienten, im rechten Bildbereich wurde diese aufgrund der divergierenden Ausgangswerte auf den Startwert vor Gabe von 5 mM Natrium-Lösung normiert (WT: $m = 4$, $t = 6$, $z = 18$; KD: $m = 3$, $t = 8$, $z = 24$).

3.3.3 Schaltzell-spezifische $[pH]_i$ -Regulation

In einem nächsten Schritt wollten wir die $[pH]_i$ -Homöostase in den Schaltzellen durch gezielte Wegnahme von extrazellulärem Chlorid untersuchen. Hierdurch wird den Chlorid-Bicarbonat-Austauscher Pendrin (luminal in den B-Typ-Schaltzellen) und AE1 (basolateral in den A-Typ-Schaltzellen) die Triebkraft genommen, die Zellen reichern intrazellulär Bicarbonat an und werden alkalisch. Bedingt durch die Materiallimitierung und experimentelle Schwierigkeiten war die Testung luminal leider nicht erfolgreich.

Zunächst zu dem inhomogenen Zellbild, auf das wir bei den vorherigen Versuchen nicht weiter eingegangen sind, da die Zellen auf den Ammoniumpuls uniform reagierten.

Im falschfarbenen Bild der kortikalen Sammelrohre kann man, obwohl nicht konfokal, durchaus die verschiedenen Zellpopulationen anhand ihres unterschiedlichen Ausgangs- $[pH]_i$ erkennen. Die Schaltzellen zeichneten sich durch leicht alkalischen $[pH]_i$ aus (siehe Abb. 49). Nach basolateraler Wegnahme von Chlorid wurden genau diese noch alkalischer, ein Prozess der auch in der Literatur beschrieben ist [6, 63, 100].

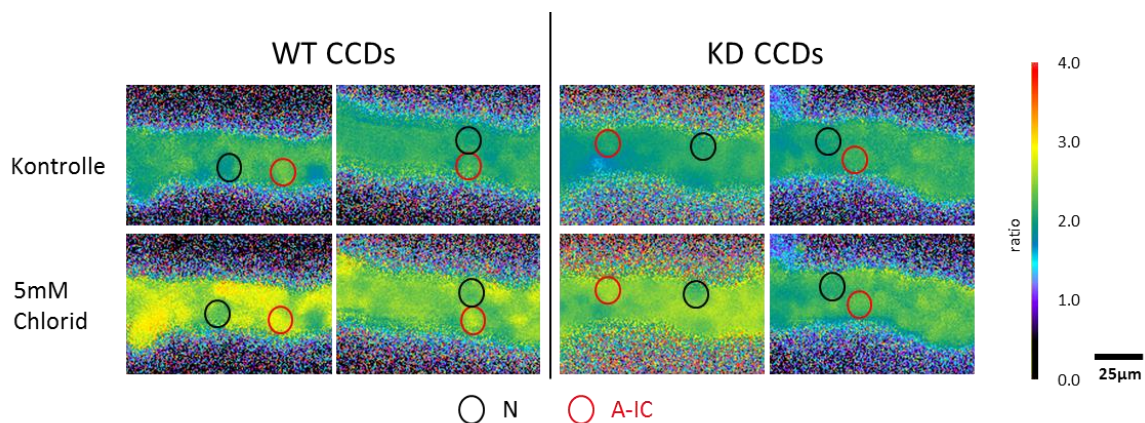


Abbildung 49: Durchführung Schaltzell-spezifische $[pH]_i$ -Regulation

Abgebildet ist das von der Metafluor-Software ausgegebene falschfarbene Bild der kortikalen Sammelrohre. Es ist jeweils pro Bild eine A-Typ-Schaltzelle (A-IC: rot) sowie eine als Nicht-Schaltzelle (N: schwarz) deklarierte Zelle markiert. Im unteren Bildbereich ist das $[pH]_i$ -Verhalten unter Wegnahme von basolateralem Chlorid gezeigt.

Der Versuch ist in Abb. 50 zusammengefasst, getrennt nach Regionen, die A-Typ-Schaltzellen repräsentieren und Nicht-A-Typ-Schaltzellen.

Deutlich sieht man den höheren Ausgangs- pH_i der A-Typ-Schaltzellen nicht unterschiedlich zwischen den Genotypen. Unter Reduktion der extrazellulären Chloridkonzentration zeigen die WT A-Typ-Schaltzellen dann eine deutlichere Alkalisierung. Da die Aufnahmen nicht

konfokal durchgeführt wurden, ist diese Alkalisierung abgeschwächt auch in den Nicht-A-Typ-Schaltzellen zu beobachten.

Die Zeitkonstante Tau zeigte sich bei der initialen Alkalisierung der A-Typ-Schaltzellen für die KD mit 5.57 ± 0.37 deutlich geringer als bei den WT mit 7.80 ± 0.52 ($p < 0.01$). Beim Auswasch zeigten sich in der Kinetik kaum Unterschiede.

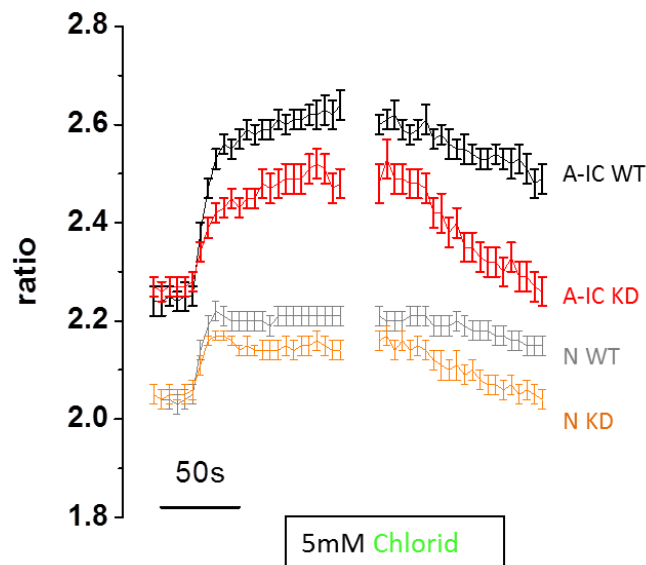


Abbildung 50: Ergebnisse Schaltzell-spezifische [pH]_i-Regulation

Abgebildet ist der Fluoreszenzquotient, in diesem Fall getrennt aufgetragen für A-Typ-Schaltzellen und Nicht-Schaltzellen jeweils für KD und WT. Für die maximale Alkalisierung ergaben sich folgende Δ Fluoreszenzquotienten: WT: $0,56 \pm 0,02$; KD: $0,34 \pm 0,02$ (WT: $m = 5$, $t = 16$, A-IC = 66, $N = 58$; KD: $m = 2$, $t = 9$, A-IC = 37, $N = 37$)

3.3.4 Elektrische Messungen

Bei den elektrischen Versuchen war es uns für die KD möglich, bei 4 Versuchstieren $n = 11$ Tubuli zu messen, für die WT konnten wir bei 6 Tieren $n = 10$ Tubuli auswerten (siehe Abb. 51).

Bei der Berechnung des Kurzschlußstromes zeigte sich, dass dieser mit $148,87 \pm 32,44 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ deutlich höher ist als bei den WT mit $43,2 \pm 7,58 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($p = 0,0007$).

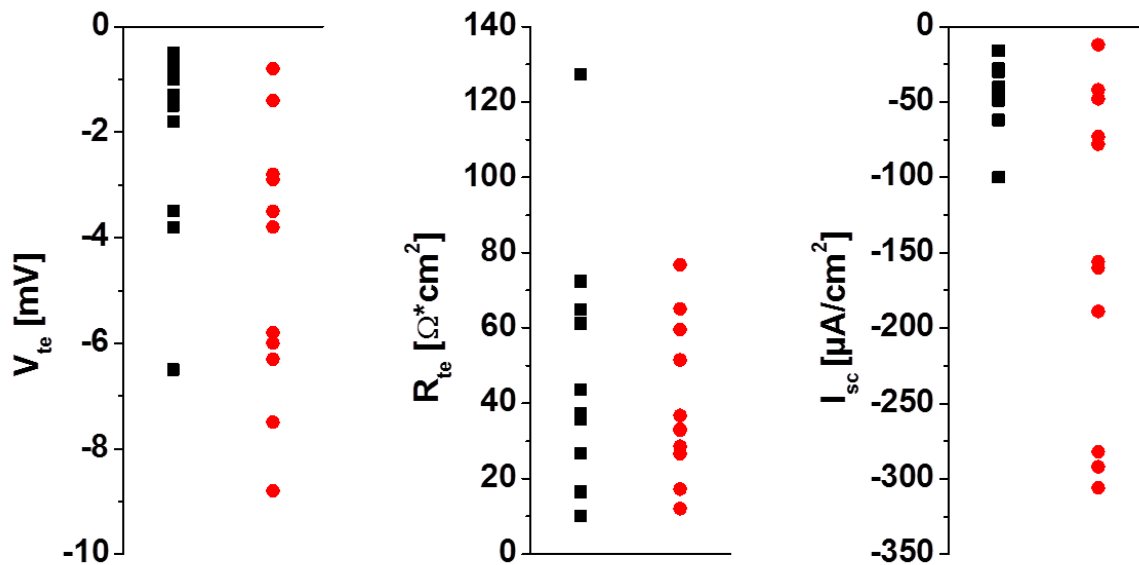


Abbildung 51: Kurzschlussströme

Abgebildet sind V_{te} , R_{te} und I_{sc} jeweils für KD und WT als Punktediagramm der Messwerte (WT: $m = 6$, $t = 10$; KD $m = 4$, $t = 11$).

Dies entspricht einer signifikant höheren elektrogenen transepithelialen NaCl-Resorption im Sammlerohr im Vergleich zu den WT.

4 Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 Metabolische Daten

Es war uns erfolgreich gelungen, mit zum Teil aufwendigen Prozessen viele signifikante Unterschiede zwischen KD und WT aufzuzeigen. Allerdings waren im Arbeitsprozess, der zu diesen Ergebnissen führte, auch oftmals Einschränkungen aufgetreten:

So wurden für die hier vorliegenden metabolischen Daten die Tiere nicht auf metabolischen Käfigen untersucht, da vor allem die Erhebung von Daten an isolierten Tubuli und Nierenschnitten im Vordergrund stand. Dieses Vorgehen ersparte den alten Tieren zwar den zusätzlichen Stress auf metabolischen Käfigen, hatte jedoch den Nachteil, dass für die Analyse kein Urinminutenvolumen zur Verfügung stand. Dies bedeutet, dass die GFR der Versuchstiere nicht direkt bestimmen werden konnte. Für Harnstoff und Kreatinin lagen im Plasma gegenüber den WT allerdings keine signifikant erhöhten Werte vor. Im Senium sind insgesamt höhere Kreatininwerte beschrieben [62], dies war für beide Tiergruppen gleichermaßen der Fall. Die tubuläre Leistung wurde über die Normierung der metabolischen Werte auf das Urin-Kreatinin, bzw. über die fraktionelle Exkretion beurteilt.

Eine weitere Einschränkung war es, dass es uns aufgrund geringer Probenvolumina nicht bei allen Tieren möglich war, die gesamte Palette der Analyte zu bestimmen. Allerdings wurde bei keinem Messwert die Anzahl von 10 KD bzw. 18 WT unterschritten.

Um ein ausreichendes Probenvolumen für die Laboranalyse bereitzustellen und um mit den Kaliumwerten nicht zu hoch zu liegen, haben wir die Urinproben im Verhältnis 1:6 mit destilliertem Wasser verdünnt. Dies führte bei einigen Proben dazu, dass sich die Konzentrationen der jeweiligen Analyte unterhalb der Bestimmungsgrenze befanden. Dies betraf die Werte für Na^+ , Cl^- , PO_4^- und Glucose. Grundsätzlich waren WT häufiger betroffen, da hier von vorneherein weniger konzentrierte Urine vorlagen. In allen Fällen wurden die Bestimmungsgrenzen als Werte eingesetzt und verblieben in der Analyse. Dadurch änderte sich nichts an der Aussage gegenüber der Analyse ohne diese Werte. Allerdings führte dies zu einer Überschätzung einiger Werte bei den WT. So wären beim Natrium, Chlorid und Phosphat die eigentlichen, niedrigeren Werte sogar für die von uns getroffenen Aussagen noch günstiger, bzw. würden den statistischen Unterschied jeweils unterstreichen und signifikanter

machen. Die Bestimmung der Glukose im Urin diente dem Ausschluss einer Glukosurie, die bei keinem der Tiere auftrat.

Des Weiteren konnten wir an vielen Stellen nur indirekt anhand der erhobenen Daten auf den hormonellen Status der Tiere schließen, da wir keine Hormonkonzentrationen direkt bestimmt haben.

Da die Versuchstiere ausnahmslos älter als 80 Wochen waren, zeigte sich eine deutliche Häufung an malignen Erkrankungen und deren Begleiterscheinungen wie Aszites und intrabdominelle Lymphknotenkonglomerate sowie Spleno- und Hepatomegalie. Es wurde versucht, die Tumoren anhand ihrer Makroskopie zuzuordnen und sie dann tabellarisch zu erfassen. Die Anzahl und die Art der Tumorentitäten verteilten sich gleichmäßig auf beide Populationen, es wurde lediglich ein WT mit einem destruierend wachsenden Nierentumor von den Experimenten ausgeschlossen. Es ist daher nicht von einer signifikanten Einschränkung der Aussagekraft der Proben auszugehen.

Es traten die folgenden Erkrankungen auf:

- Lymphome
- Gastrointestinale Tumore (Magen, Kolon)
- Ovarialtumore
- Uterustumore
- Lebertumore
- Samenblasentumore

4.1.2 Morphometrie

Unsere Daten in Bezug auf die Morphometrie der Knochen können ebenfalls nur indirekte Hinweise auf das mögliche Vorliegen einer verminderten Knochendichte im Sinne einer Osteoporose geben. Eine direkte Densitometrie der Knochen wurde von uns nicht vorgenommen. Da sich aber die Knochen der KD weder in Größe noch in Gewicht von denen der WT signifikant unterscheiden, konnten wir keinen Anhalt dafür feststellen, dass es zu einem Progress der in der Literatur beschriebenen verminderten Knochendichte bei jungen KD kommt [45]. Trotz eines gestörten Calciumhaushaltes war bei den KD makroskopisch keine Störung der Knochenbildung erkennbar, sodass die normwertigen Plasmaspiegel von Calcium und Phosphat mutmaßlich nicht zu Lasten der Knochendichte aufrechterhalten werden.

Die Änderungen in der makroskopischen Struktur der Tubuli, sprich die Erhöhung des Durchmessers und der Verlust des Pflastersteinreliefs, sind vermutlich am ehesten als Alterserscheinungen zu werten, da sich diese strukturelle Veränderung sowohl bei den KD als auch bei den WT finden lässt (siehe 3.2.1). Allerdings blieb der Eindruck, dass derartige Veränderungen bei den KD häufiger auftraten. Eine quantitative Auswertung dieses Phänomens war aufgrund des Fehlens von geeigneten Methoden nicht möglich. Diese makroskopischen Veränderungen könnten das Korrelat zu den Änderungen auf mikroskopischer Ebene in Bezug auf das vermehrte Auftreten von Schaltzellen in den kortikalen Segmenten der Kryoschnitte sein.

4.1.3 Proteinbiochemie

Bei unseren immunhistochemischen Färbungen ergaben sich Unterschiede zwischen den isolierten Tubuli und den Kryoschnitten. Bei den Kryoschnitten erfolgte zeitgleich mit dem Tod des Versuchstieres die Fixierung der Zellen durch PFA-Perfusion der Nieren. Zellen und Tubuli sind anatomisch lokalisiert und aufgrund des Anschneidens für die Antikörper offengelegt. Allerdings lassen sich einzelne Tubuli hier kaum verfolgen.

Die isolierten Tubuli befanden sich während der Präparation mindestens drei bis vier Stunden nach dem Tod des Gesamtorganismus in der Inkubationslösung bei 4 °C, sodass sie prinzipiell noch mit einer Änderung ihrer Proteinexpression und Proteinlokalisierung reagieren konnten. Dies könnte durchaus einen Effekt auf schnell regulierbare Transporter wie die vH^+ -ATPase [84] haben. Es ist sogar Gegenstand aktueller Diskussion, ob die Möglichkeit besteht, dass die vH^+ -ATPase aus der luminalen Membran in die basolaterale transloziert werden kann [93], sprich ein Umbau von A-Typ- zu B-Typ-Schaltzelle möglich ist [92, 94, 103]. Bei den isolierten Tubuli handelte es sich dafür aber um einen intakten Zellverband, der über eine große Länge einzeln betrachtet werden kann. Andererseits war die Zugänglichkeit der luminalen Membran aufgrund eines kollabierten Tubuluslumens z.T. für gewisse Antikörper deutlich eingeschränkt. So ließ sich z.B. im Vergleich zu den Kryoschnitten AQP2 in den isolierten Tubuli nicht ausreichend, der Calcium-Kanal TRPV5 gar nicht anfärben.

Mit unserer Messmethode zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen, bei der wir die Färbungsintensität des äußersten μm der Plasmamembran mit der des Restes der Zelle verglichen, konnten wir ebenfalls zunächst nur qualitative, die intrazelluläre Lokalisation betreffende Aussagen machen. Daher führten wir zur Quantifizierung die Westernblotanalysen für die einzelnen Transportproteine durch.

Allerdings muss auch hier einschränkend festgestellt werden, dass alle unsere Ergebnisse durch die Auswahl und Verfügbarkeit der benutzten Antikörper limitiert sind, da es nicht möglich ist, bei einem derart komplexen System die Gesamtheit aller Transportproteine darzustellen.

4.1.4 Tubulusperfusion

Die isolierte Tubulusperfusion stellt an den Untersucher die höchsten technischen Ansprüche: Es erwies sich stets als schwierig, intakte Tubuli einer gewissen Mindestlänge in das Perfusionssystem einzuspannen ohne diese zu perforieren.

Zum Ende unserer Versuchsreihen waren wir zudem durch das zur Verfügung stehenden Material aufgrund des raschen altersbedingten Versterbens zahlreicher Versuchstiere deutlich eingeschränkt. Daher waren uns selektive Perfusionsuntersuchungen getrennt nach Typ-A- und Typ-B-Schaltzellen nicht möglich.

4.2 Auswirkungen der langfristigen Claudin-16-Defizienz im Mausmodell

4.2.1 Nierenfunktion und Elektrolythaushalt in der alternden Maus

Diese Doktorarbeit beschreibt Unterschiede zwischen alten Mäusen mit lebenslangem Defekt in Claudin-16 und somit gestörter Funktion der TAL und ihren entsprechenden Geschwistertieren. Dies soll in den folgenden Abschnitten deshalb vornehmlich diskutiert werden. Darüber hinaus zeigen die Daten immer wieder deutliche Unterschiede in Nierenfunktion, Elektrolythaushalt und Nierenmorphologie zwischen den alten Tieren beider Gruppen gegenüber deutlich jüngeren Versuchstieren, die im Rahmen einer Vorgängerstudie untersucht worden waren.

Veränderungen dieser Art in der Nierenfunktion bei Mäusen sind in der Literatur relativ unterrepräsentiert und wenig systematisch untersucht. Auf der anderen Seite werden sie im Rahmen eines immer älter werdenden Patientengutes aber auch interessanter, auch wenn die Maus an sich mit ihrer kleinen Lebenserwartung hier wahrscheinlich nur ein suboptimales Tiermodell für den Menschen darstellt.

Die in den alten Tieren gemessenen Kreatinin- und Harnstoffwerte im Plasma waren gut vereinbar mit den zu erwartenden Nierenfunktionseinschränkungen im Alter [62]. Vergrößerte und plumpe Glomeruli sowie ein vermehrtes Tubulointerstitium als Hinweis auf

sklerosierende Prozesse waren ebenfalls in beiden Gruppen zu finden [3]. In DCT und CNT waren deutliche Zeichen von zellulärer Hypertrophie in den verbliebenen Nephronen zu erkennen. Die im Vergleich verminderte Urinosmolalität bestätigte die eingeschränkte Konzentrationsfähigkeit.

Unsere Befunde deuteten auf einen durchgehenden Verlust tubulärer Funktion mit gesteigerten fraktionellen Exkretionen aller Ionen hin. Die Veränderungen der Konzentrationen an Natrium, Chlorid und Kalium können ebenfalls auf ein verändertes Ansprechen der Niere auf die regulierenden Hormone Aldosteron und ADH zurückzuführen sein [8, 69, 81]. Die FE Ca^{2+} in unserer Untersuchung war bei den KD 2,2-fach höher als in den jüngeren Tieren und bei den WT sogar 5,6-fach. Van Abel et al. konnten nachweisen, dass die mRNA Expression der für den Kalziumtransport wichtigen Proteine TRPV5 und CalbindinD28K in 52 Wochen alten Mäusen auf etwa zwei Drittel der Expression 10 Wochen alter Mäuse abgesunken war [1]. Da die Serumhormonkonzentration von Parathormon und Calcitriol gleichzeitig zunahm, spricht vieles für eine verminderte Antwort auf diese Hormone.

In der Literatur fanden sich, ähnlich wie für die Azidifizierung des Urins, keine Hinweise oder Erklärungen für höhere Plasmamagnesiumkonzentrationen in älteren Mäusen.

4.2.2 Das FHHNC-Mausmodell in Alter

Patienten mit FHHNC zeigen auf Grund der Niereninsuffizienz eine deutlich eingeschränkte Lebenserwartung [11, 54, 72].

Obwohl die Kernsymptome Hypercalciurie und Hypomagnesiämie bei den alten KD vorlagen [38] erreichten die Tiere ein hohes Lebensalter. Allerdings ergab sich der Eindruck, dass ab ca. 1,5 Lebensjahren die Sterberate bei den KD über der der WT lag. Allerdings haben wir dies bei der kleinen Fallzahl nicht weiter statistisch ausgewertet.

Wir konnten jedoch zeigen, dass der Knockdown von Claudin 16, bzw. die Einschränkungen im Elektrolythaushalt, zu einer Beeinträchtigung des Gesamtorganismus führten. Schon für junge Mäuse ist eine deutliche Gewichtsreduktion für die KD beschrieben [38]. Die KD waren auch bis ins hohe Alter kleiner und leichter als ihre WT-Geschwistertiere.

In den folgenden Abschnitten sollen die Faktoren beleuchtet und eingeordnet werden, die gegebenenfalls zu dieser Einschränkung führen.

4.2.3 Calcium- und Magnesium-Haushalt

Mit deutlicher Hypercalciurie sowie der Hypomagnesiämie lag der typische Phänotyp der FHHNC auch bei den alten KD vor [38]. Die Hypomagnesiämie scheint sogar aufgrund der höheren Plasma-Magnesiumwerte im Alter noch aggraviert zu sein. Diese Altersanpassung scheint bei den alten KD gestört, bzw. nicht möglich zu sein. Zusätzlich zu den oben genannten Altersveränderungen zeigten die KD im Alter immer noch im Vergleich zu den WT eine stark gesteigerte Kalziumausscheidung mit dem Urin.

Wir konnten in den alten Mäusen eine erhöhte Expression von TRPV5 in der luminalen Membran der KD zeigen. In Vorarbeiten konnte dies bereits auf RNA-Ebene auch für jüngere Tiere in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden [28]. Diese Heraufregulation dient sehr wahrscheinlich dazu, einen Teil des Calcium-Verlustes auszugleichen.

Anhand der Knochenmakroskopie und der metrischen Parameter konnten wir keine Hinweise auf vermehrtes Auftreten einer möglichen Osteoporose bei den KD feststellen.

Es wird in der Literatur beschrieben, dass der TRPV5-Kanal und das Calciumtransportprotein Calbindin durch erniedrigte intra- und extrazelluläre pH-Werte inhibiert wird [66, 104]. Auch die Magnesiumabsorption im DCT scheint bei azidem Primärharn vermindert [20].

Es erscheint demnach sinnvoll, im DCT und im Cortex allgemein extreme Azidifizierung zu vermeiden. Dies könnte z.B. durch einen erhöhten Besatz von Bicarbonat-sezernierenden Transportern wie dem Pendrin in diesem Bereich geleistet werden. Da gleichzeitig auch ein niedriger Urin-pH die Entstehung von Nierensteinen bei hohen Urin-Kalziumkonzentrationen verhindern hilft [97] erschien es wichtig, den Säure-Base-Transport entlang des Nephrons näher zu beleuchten.

4.2.4 Säure-Base-Haushalt

Bei den jungen KD waren ein azider Urin-pH und ein erhöhtes Plasma-Bicarbonat aufgefallen. Ähnlich wie in anderen Tiermodellen mit ausgeprägter Hypercalciurie (z.B. bei der TRPV5-Knockout-Maus) wird angenommen, dass über die Aktivierung des im Sammelrohr luminal gelegenen *calcium-sensing-receptor* (CaSR) eine Azidifizierung des Urins und eine Polyurie induziert wird, um Steinbildung zu verhindern [77].

In unseren Daten von alten Tieren zeigte sich keine Retention von Bicarbonat oder Anzeichen einer metabolischen Alkalose mehr, im Urin war kein signifikanter Unterschied mehr bei den pH-Werten erkennbar, da vor allem die alten WT mit ihrem pH auf niedrigere Werte deszendierten (siehe 3.1.4.).

Zusätzlich zum pH in Blut und Urin und den entsprechenden Bicarbonat-Werten haben wir auf molekularer Ebene die Expression und Verteilung verschiedener am Säure-Base-Transport beteiligter Proteine genauer untersucht:

Wir konnten sowohl in der Immunhistochemie als auch in der Proteinbiochemie eine signifikante Heraufregulierung des Pendrin-Membraneinbaus in den kortikalen Sammelrohren feststellen (siehe 3.2.2.1.).

Für die vH^+ -ATPase war in den Kryoschnitten zu sehen, dass kortikal sogar tendenziell eher weniger exprimiert war, wohingegen weiter distal, sprich in den medullären Anteilen, der Membraneinbau bei den KD deutlich gesteigert war (siehe 3.2.2.1).

Für den AE1 konnten wir zwar keine signifikanten Unterschiede feststellen, allerdings war sowohl in den Kryoschnitten als auch in den isolierten Tubuli ein Trend zu einem geringeren Membraneinbau in den KD zu sehen. Dies mag auch ein Hinweis auf eine verminderte A-Typ-Schaltzellaktivität in den KD sein. Wobei allerdings gesagt werden muss, dass der AE1 in den Kryoschnitten nicht getrennt für Mark und Medulla betrachtet wurde, da zumindest augenscheinlich keine Unterschiede im Membranbesatz zu erkennen waren. Ob die Regulation der AE1-Funktion über die Proteinmenge oder über die Transportaktivität geschieht, ist zurzeit noch Gegenstand der Diskussion [93].

Sehr viele kortikale Zellen, die positiv auf Pendrin waren, wiesen luminal auch die vH^+ -ATPase auf und wir gehen davon aus, dass es sich um die bereits eingeführten Non-A-Non-B-Schaltzellen handelt. Es wird in der Literatur beschrieben, dass diese Zellen im CNT der Maus besonders häufig vorkommen und dort sogar über die Hälfte der Schaltzellen ausmachen [50, 61]. Im kortikalen Sammelrohr sind es immerhin noch bis zu 22%. In diesen Zellen ist das Pendrin im Vergleich zu den B-Typ-Schaltzellen (in denen es eher vesikulär vorkommt [61, 94]) verstärkt luminal lokalisiert, sodass sogar ein höherer Membraneinbau als in der B-Typ-Schaltzelle auftreten kann [94].

In der Forschung gibt es allerdings auch Gruppierungen, die die Lehrmeinung vertreten, es handele sich bei den verschiedenen Intercalated cells um unterschiedliche Funktionszustände ein und derselben Zellspezies [2, 51, 89, 93].

Unsere Befunde in Bezug auf die Verteilung der Säure-Base-Transporter entlang des distalen Nephrons sind bezüglich des Urin-pH also nicht schlüssig: Während im CNT und im kortikalen Sammelrohr vor allem mehr Bicarbonat sezernierende Zellen - in gewisser Weise - aktiviert sind, scheint medullär vermehrt Säuresekretion stattzufinden.

Wir vermuten daher, dass durch die veränderte Expression dieser Transportproteine wesentliche Adaptionsprozesse bezüglich des Volumen- und Elektrolythaushaltes stattfinden, die im nächsten Abschnitt besprochen werden sollen und weniger Adaptionsprozesse im Säure-Base-Haushalt.

4.2.5 Salz- und Wasserhaushalt

Für die jungen KD war ein verdeckter NaCl- und Volumenverlust vorbeschrieben [38] worden. In den alten Mäusen fanden sich nun diverse Hinweis auf einen evidenten chronischen Volumenmangel. Zwar waren die Plasmaelektrolyte ausgeglichen, jedoch waren sowohl HKT als auch Urinosmolalität erhöht im Vergleich zu WT. Unter diesem chronisch bestehenden Elektrolytzustand waren die FE Na⁺ und FE Cl⁻ nicht verändert, aber das zugunsten des Natrium verschobene Verhältnis von U Na⁺/U K⁺ lieferte einen Hinweis auf eine deutliche Aldosteronaktivierung mit verstärkter Natriumrückresorption über ENaC und Kaliumsekretion über ROMK im Sammelrohr.

Für den β-ENaC konnten wir zwar keine Unterschiede in der Membranverteilung feststellen, jedoch kann der ENaC außer über die Anzahl der Kanäle auch über die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals reguliert sein [21]. Hierfür sind in der Literatur Prozesse beschrieben, die auf Proteasen und der Komposition der verschiedenen Untereinheiten basieren und dazu führen, dass bei gleicher Anzahl an Kanälen der Natriumstrom um ein vielfaches höher ist [34]. Zusätzlich wurde eine Aktivitätsänderung in Abhängigkeit des pH-Wertes beschrieben [33].

Dieser Mechanismus mit vermehrter Natriumrückresorption im Sammelrohr wurde schon für junge KD als Kompensation für vermehrt distal anflutendes NaCl beschrieben [45]. Auch die Stimulation der distalen A-Typ-Schaltzellen könnte auf Aldosteronstimulation zurückzuführen sein, da Aldosteron bekanntermaßen zusätzlich zu einer Azidifizierung des Urins führt [89, 96]. Die Ansäuerung des Urins, von der man annimmt, dass sie dazu nötig ist, das Calcium in Lösung zu halten [77, 93, 97], findet anscheinend also erst weiter distal im Tubulus statt.

Wir vermuten, dass die verstärkte Expression von Pendrin in CNT und kortikalem Sammelrohr weniger der pH-Regulation als vielmehr der Chlorid-Reabsorption und somit der Volumenregulation dient [91]. Diese Funktion des Pendrins konnte bereits von diversen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden [9, 35, 91, 93, 95] und es konnte gezeigt werden, dass der Chloridtransport im distalen Tubulus zum Großteil transzellulär über Schaltzellen erfolgt und nicht über die Hauptzellen [69, 78]. So konnten Verlander et al. und Wall et al.

nachweisen, dass unter Bedingungen des chronischen Chlorid-Mangels Pendrin heraufreguliert wurde [93, 76, 91, 95]. Dabei ist ein Chloridmangel sogar anscheinend ein stärkerer Trigger für Gegenregulationsmaßnahmen im Sinne eines Transportereinbaus als Natriummangel [8, 33]. Die B-Typ-Schaltzellen sind bei Pendrinaktivierung sogar in der Lage, über parakrine Signalwege den Natriumtransport über die PC zu aktivieren [33] sowie den Chloridtransport mit einem Natriumtransport über den NDCBE (natriumabhängiger Chlorid/Bicarbonat-Exchanger) zu koppeln [33].

Allerdings sind in Bezug auf den Stimulus der Pendrin-Regulation die bisher publizierten Ergebnisse bei Weitem nicht einheitlich. So konnte z.B. bei einer akuten Anflutung von Chlorid im distalen Nephron eine Reduktion des Pendrins gezeigt werden [93], wohingegen von Quentin et al. bei chronischem Chloridmangel eine Heraufregulation nachgewiesen wurde, die nur vom Serumchlorid und nicht vom Urinchlorid abhängig ist [76]. Auch wenn in unserer Studie die Plasma-Chloridkonzentration im Vergleich zu den WT nicht signifikant erniedrigt war, zeigt sie doch eine entsprechende Tendenz, so dass hier das Plasmachlorid wahrscheinlich die größere Rolle spielt, da aufgrund der geringeren NaCl Rückresorption in der TAL [38] das luminale Chlorid-Angebot eventuell sogar erhöht sein sollte.

Es ist durchaus denkbar, dass die Non-A-Non-B-Schaltzellen hier eine wichtige Rolle spielen. Aldosteron steigert in diesen Zellen den Membraneinbau von Pendrin anscheinend sogar stärker als in den B-Typ-Schaltzellen [90]. Es konnte in den Non-A-Non-B-Schaltzellen ein Membranshuffle [68] sowie ein *trafficking* von Pendrin und der vH^+ -ATPase gezeigt werden [61, 91], sodass es, passend zu unseren Befunden, sogar zu einer Polaritätsänderung der Zelle kommen kann [61].

Eine weitere Ursache für das vermehrte Aufkommen an Pendrin könnte aber auch sein, dass dies dazu dient, einer metabolischen Alkalose entgegenzuwirken, wie sie in den jungen KD beschrieben wurde [38], da Pendrin bei einer derartigen Stoffwechsellage eine Heraufregulierung erfährt [9, 93]. Bei einem von uns postulierten intravasalen Volumenmangel ist von erhöhten Spiegeln von Aldosteron und Angiotensin-II auszugehen, welche beide erwiesenermaßen das Pendrin stimulieren [33]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es ohne Pendrin keine NaCl-Restriktion bei gesteigerten Aldosteronspiegeln gibt [33]. Einen weiteren interessanten Aspekt im Zusammenspiel der verschiedenen Transportproteine könnten die jüngsten Ergebnisse von Pech et al. Darstellen, die zeigen, dass Pendrin durch die luminale pH-Erhöhung die ENaC-Funktion steigern kann [70].

In der TAL konnten wir einen signifikant vermehrten Membraneinbau von NKCC2 zeigen, der sich dann auch in den Kryoschnitten reproduzieren ließ. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf den uns vermuteten Verlust an Natrium und Chlorid und der daraus resultierenden gestörten Volumenhomöostase sein. Anscheinend findet bereits hier, am Ort des Defektes, eine Gegenregulation statt.

Am Ende dieses Abschnitts sollen die Ergebnisse, die wir am isoliert perfundierten Tubulus erhoben haben, in der Zusammenschau der bis jetzt diskutierten Veränderungen der Transportvorgänge im kortikalen Sammelrohr der alten KD betrachtet werden:

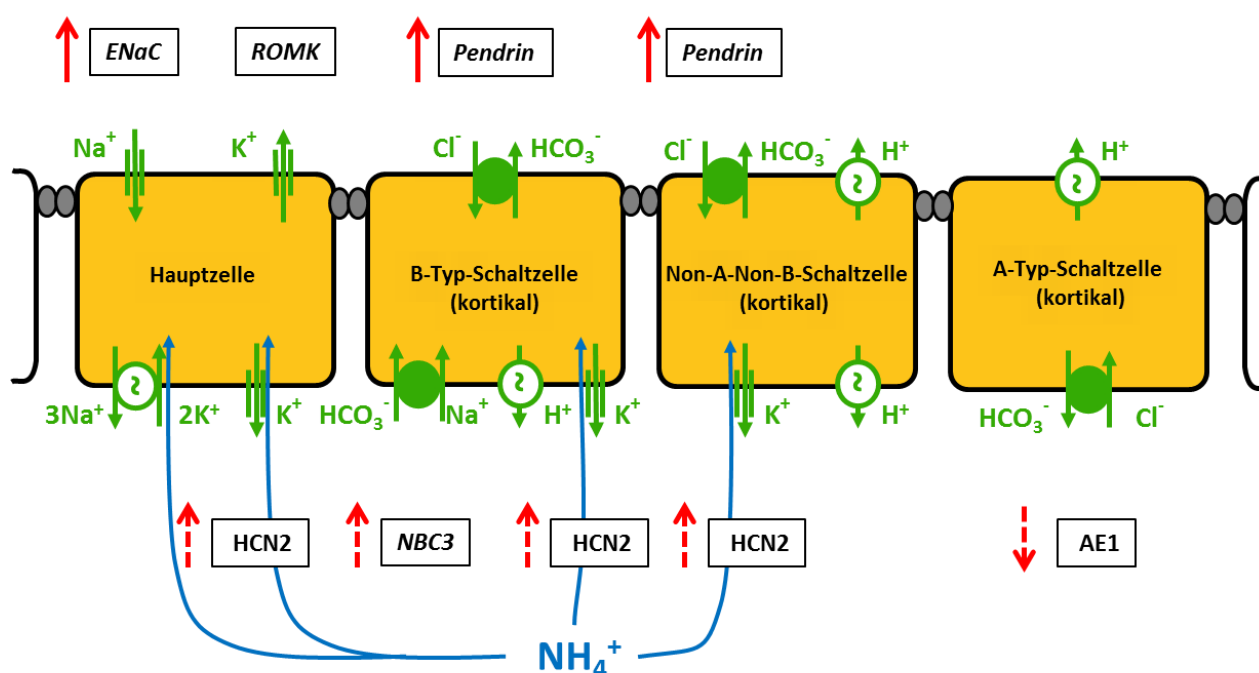


Abbildung 52: Transportvorgänge an isoliert perfundierten Tubuli

In blau aufgezeigt sind die vermuten Transportwege für Ammonium. Mit roten Pfeilen sind Herauf- oder Herunterregulation von entsprechenden Transportproteinen gekennzeichnet, für ENaC und Pendrin sind diese elektrophysiologisch oder proteinbiochemisch nachgewiesen, für HCN2, NBC3 und AE1 aufgrund der Daten am isolierten kortikalen Sammelrohr hypothetisiert (gestrichelte Pfeile).

Wir konnten zeigen, dass allein bei den KD ein relevanter amiloridhemmbarer Kurzschlußstrom vorliegt, welcher unmittelbar eine erhöhte Aktivität von ENaC und Aldosteron nachweist (siehe Abb. 52) [21, 34]. Dieser entspricht sowohl vom Trend als auch von der Größenordnung (ca. fünffach) demjenigen Kurzschlußstrom, den wir bereits in den jungen KD nachweisen konnten [38].

Der auffälligste Befund in der pH_i -Messung in den kortikalen Sammelrohren war die vermehrte Durchlässigkeit der Zellen für basolaterales Ammonium. Ammonium kann, im Gegensatz zu Ammoniak, biologischen Membranen selbst nur recht schlecht passieren, kann aber Transportwege für Kalium nutzen, da es dem Kalium vergleichbare molekulare Eigenschaften besitzt. Neben der Natrium-Kalium-ATPase [4, 48, 87, 93] kommt hierfür auch der Kaliumkanal HCN2 (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel*) in Frage, der in kortikalen Sammelrohren auch bereits beschrieben wurde [17]. Die Hochregulation sowohl der Natrium-Kalium-ATPase als auch des Kaliumkanals (siehe Abb. 52) können über eine Triebkrafteerhöhung wiederum die Transportleistung der Sammelrohrzellen steigern, ähnlich wie dies für das EAST-Syndrom für andere Kaliumkanäle beschrieben ist [10].

Die Messung der für uns eigentlich interessanteren B-Typ –Schaltzellen schlug aufgrund von experimentellen Schwierigkeiten leider fehl, jedoch konnten wir nachweisen, dass im kortikalen Sammelrohr AE1 funktionell eher herunterreguliert ist. Auf Expressionsebene konnten wir hingegen genauso wie Mohebbi et al. keine Veränderungen feststellen [64].

Des Weiteren fanden wir Hinweise auf die Hochregulation eines basolateralen natriumgekoppelten Transportweges mit einer deutlich beschleunigten pH-Regeneration in Anwesenheit von Na^+ bei den KD (siehe 3.3.2). Hierbei nutzten wir den basolateralen NHE zur intrazellulären Azidifizierung durch Wegnahme des extrazellulären Natriums und Umkehr des Transporters. Die Azidifizierungsraten waren dabei zwischen WT und KD vergleichbar was gegen eine direkte Beteiligung eines NHEs an dem Befund spricht. In der Literatur findet sich für basolateral und das kortikale Sammelrohr der Natrium-Bicarbonat-Austauscher NBC3 als möglicher Kandidat (siehe Abb.52) [55, 74].

5 Zusammenfassende Betrachtung und Ausblick

Der Knockdown von Claudin-16 stellt ein Tiermodell für die Krankheit FHHNC (Familiäre Hypomagnesiämie mit Hypercalciurie und Nephrocalcinose) dar. Den Erkrankten drohen durch den renalen Verlust an Calcium und Magnesium schwerwiegende Entgleisungen der Plasmaelektrolyte sowie eine terminale Niereninsuffizienz. Allerdings gelingt sowohl manchen Patienten mit mildem Ausprägungsgrad als auch den Knockdown-Mäusen (KD) ein Langzeit-Überleben mit akzeptablen Einschränkungen. Daraus läßt sich auf entsprechende Anpassungsmechanismen schließen.

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen waren 5-25 Wochen alte KD, die typische Symptome der FHHNC sowie eine metabolische Alkalose, Hypotonie, Hypokaliämie und Azidurie zeigten. In dieser Arbeit untersuchten wir im Vergleich wesentlich ältere Versuchstiere (> 80 Wochen) mit morphologischen, metabolischen und funktionellen Techniken, um Kompensationsmechanismen im Bereich renal-tubulärer Transportsysteme aufzuzeigen. Wie die jungen Tiere waren auch die Knockdown-Mäuse signifikant kleiner und leichter als ihre gesunden Geschwister. Darüber hinaus ergaben sich auf makroskopischer Ebene keine Unterschiede und auch keine, über das Altersmaß hinausgehende Osteoporose. Die metabolischen Daten wiesen weiterhin einen renalen Calcium- und Magnesiumverlust sowie eine Hypomagnesiämie nach. Die Kaliumkonzentration sowie der Säure-Base-Haushalt im Plasma waren ausgeglichen. Die Azidurie persistierte, allerdings boten nun auch die gesunden alten Tiere einen ähnlich aziden Urin. Ein wichtiger Befund war der Verlust von NaCl über den Urin. Der im Vergleich konzentriertere Urin, ein verminderter Quotient UNatrium/UKalium sowie ein erhöhter Hämatokrit wiesen auf eine chronische Hypovolämie und auf eine erhöhte Aldosteronkonzentration hin. Mittels Immunfluoreszenz konnten wir die vermehrte Membranexpression von Transportproteinen nachweisen, die einer kompensatorischen Steigerung der NaCl und Ca^{2+} -Resorption dienen. Hierzu gehörten die erhöhte Expression des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers Pendrin, die vH^+ -ATPase, der $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -Kotransporter sowie der Calciumkanal TRPV5 und der Kaliumkanal KCNJ16.

Die hier beschriebenen Veränderungen sind Ausdruck einer langfristigen metabolischen Umstellung zur Aufrechterhaltung der Volumen- und Elektrolythomöostase und damit einer Anpassung zur Verhinderung von möglichen Spätschäden. Hierbei scheint langfristig vor allem die NaCl-Bilanzierung problematisch, und könnte Ansatz für therapeutische Überlegungen sein. Damit sollte diese Arbeit einen Beitrag zum Verständnis der zwar

seltenen, aber häufig schwer verlaufenden FHHNC leisten, für die aktuell weiterhin nur unzureichende symptomatische und keine kurativen Therapieansätze existieren.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

1. **Monique van Abel, Sylvie Huybers, Joost G. J. Hoenderop, Annemiete W. C. M. van der Kemp, Johannes P. T. M. van Leeuwen, and René J. M. Bindels**
Age-dependent alterations in Ca²⁺ homeostasis: role of TRPV5 and TRPV6
Am J Physiol Renal Physiol 291: F1177–F1183, 2006.
2. **Al-Awqati Q.** Plasticity in epithelial polarity of renal intercalated cells: targeting of the H⁽⁺⁾-ATPase and band 3. Am J Physiol. 1996 Jun;270(6 Pt 1):C1571-80.
3. **Amann K.** Altersbedingte Änderungen der Nierenmorphologie und –funktion, Medicom Ausgabe 02/08
4. **Amel Attmane-Elakeb, Hassane Amlal and Maurice Bichara,** Ammonium carriers in medullary thick ascending limb, Am J Physiol Renal Physiol 280:F1-F9, 2001.
5. **Amlal H, Petrovic S, Xu J, Wang Z, Sun X, Barone S, Soleimani M.** Deletion of the anion exchanger Slc26a4 (pendrin) decreases apical Cl⁽⁻⁾ / HCO₃⁽⁻⁾ exchanger activity and impairs bicarbonate secretion in kidney collecting duct. Am J Physiol Cell Physiol. 2010 Jul;299(1):C33-41. Epub 2010 Apr 7.
6. **Amlal H, Soleimani M.** K⁺/NH₄⁺ antiporter: a unique ammonium carrying transporter in the kidney inner medulla. Biochim Biophys Acta. 1997 Jan 31;1323(2):319-33.
7. **Alper SL, Natale J, Gluck S, Lodish HF, Brown D.** Subtypes of intercalated cells in rat kidney collecting duct defined by antibodies against erythroid band 3 and renal vacuolar H⁺-ATPase, Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Jul;86(14):5429-33.
8. **Juan Pablo Arroyo, Caroline Ronzaud, Dagmara Lagnaz, Olivier Staub and Gerardo Gamba,** Aldosterone Paradox: Differential Regulation of Ion Transport in Distal Nephron, Physiology 26:115-123, 2011.

9. **Azroyan A, Laghmani K, Crambert G, Mordasini D, Doucet A, Edwards A.** Regulation of pendrin by pH: dependence on glycosylation. *Biochem J.* 2011 Feb 15;434(1):61-72.
10. **Bandulik S, Schmidt K, Bockenhauer D, Zdebik AA, Humberg E, Kleta R, Warth R, Reichold M.** The salt-wasting phenotype of EAST syndrome, a disease with multifaceted symptoms linked to the KCNJ10 K⁺ channel. *Pflugers Arch.* 2011 Apr;461(4):423-35. Epub 2011 Jan 11.
11. **Benigno V, Canonica CS, Bettinelli A, von Vigier RO, Truttmann AC, Bianchetti MG.** Hypomagnesaemia-hypercalciuria-nephrocalcinosis: a report of nine cases and a review. *Nephrol Dial Transplant.* 2000 May;15(5):605-10.
12. **Bindels RJ.** Calcium handling by the mammalian kidney. *J Exp Biol.* 1993 Nov;184:89-104.
13. **Bleich M, Shan QX** Epithelial K(+) channels: driving force generation and K(+) recycling for epithelial transport with physiological and clinical implications. *Sheng Li Xue Bao.* 2007 Aug 25;59(4):443-53.
14. **Brown D, Hirsch S, Gluck S.** Localization of a proton-pumping ATPase in rat kidney. *J Clin Invest.* 1988 Dec;82(6):2114-26.
15. **Bukoski RD.** Linkage of Na(+) and Ca(2+) balance: evidence that Na(+) retention preserves Ca(2+) balance and limits bone wasting. *J Hypertens.* 2004 Apr;22(4):683-5.
16. **Butterworth MB.** Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by membrane trafficking. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Dec;1802(12):1166-77. Epub 2010 Mar 27.
17. **Rolando Carrisoza-Gayta'n, Claudia Rangel, Carolina Salvador, Ricardo Saldan~a-Meyer, Christian Escalona, Lisa M. Satlin, Wen Liu, Beth Zamilowitz, Joyce Trujillo, Norma A. Bobadilla and Laura I. Escobar,** The hyperpolarization-

- activated cyclic nucleotide-gated HCN2 channel transports ammonium in the distal nephron, *Kidney International* (2011) 80, 832–840; doi:10.1038/ki.2011.230;
18. **Jae Hyun Chang, M.D. and Sejoong Kim, M.D.** Role of Pendrin in Acid-base Balance. *Electrolytes & Blood Pressure* 7:20-24, 2009
 19. **Cupples WA, Braam B.** Assessment of renal autoregulation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Apr;292(4):F1105-23. Epub 2007 Jan 16.
 20. **Dai LJ, Ritchie G, Kerstan D, Kang HS, Cole DE, Quamme GA.** Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule. *Physiol Rev*. 2001 Jan; 81(1):51-84.
 21. **Eaton DC, Malik B, Bao HF, Yu L, Jain L.** Regulation of epithelial sodium channel trafficking by ubiquitination. *Proc Am Thorac Soc*. 2010 Feb;7(1):54-64.
 22. **Cheryl Emmons and Ira Kurtzt** Functional Characterization of Three Intercalated Cell Subtypes in the Rabbit Outer Cortical Collecting Duct. *J Clin Invest*. 1994 January; 93(1): 417–423.
 23. **Frank AE, Weiner ID.** Effects of ammonia on acid-base transport by the B-type intercalated cell. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Aug;12(8):1607-14.
 24. **Sebastian Frische, Tae-Hwan Kwon, Jørgen Frøkiær, Kirsten M. Madsen and Søren Nielsen,** Regulated expression of pendrin in ra kidney in response to chronic NH₄Cl or NaHCO₃ loading, *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F584–F593, 2003.
 25. **Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S.** Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*. 1998 Jun 29;141(7):1539-50.
 26. **R S Goldstein, J B Tarloff and J B Hook,** Age-related nephropathy in laboratory rats, *The FASEB Journal* vol. 2 no. 7 2241-2251

27. **Good DW.** Ammonium transport by the thick ascending limb of Henle's loop. *Annu Rev Physiol.* 1994;56:623-47.
28. **Dissertation Bören Görke;** Störungen im renalen Ionentransport und Säure-Basen Haushalt der Claudin-16 defizienten Maus
29. **R. Greger ,** Cation Selectivity of the Isolated Perfused Cortical Thick Ascending Limb of Henle's Loop of Rabbit Kidney, Max-Planck-Institut für Biophysik, Kennedyallee 70, D-6000 Frankfurt/Main, Federal Republic of Germany
30. **De Groot T, Lee K, Langeslag M, Xi Q, Jalink K, Bindels RJ, Hoenderop JG.** Parathyroid hormone activates TRPV5 via PKA- dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Aug;20(8):1693- 704. Epub 2009 May 7.
31. **Günzel D, Yu AS.** Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle. *Pflugers Arch.* 2009 May;458(1):77-88. Epub 2008 Sep 16.
32. **Günzel D, Yu ASL.,** Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiol Rev* 93: 000–000, 2013; doi:10.1152/physrev.00019.2012.
33. **Hadchouel J, Büsst C, Procino G, Valenti G, Chambrey R, Eladari D. A.** Regulation of extracellular fluid volume and blood pressure by pendrin. *Cell Physiol Biochem.* 2011;28(3):505-12.
34. **Haerteis S, Krueger B, Korbmacher C, Rauh R.** The delta-subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) enhances channel activity and alters proteolytic ENaC activation. *J Biol Chem.* 2009 Oct 16;284(42):29024-40. Epub 2009 Aug 28.
35. **Hafner P, Grimaldi R, Capuano P, Capasso G, Wagner CA.** Pendrin in the mouse kidney is primarily regulated by Cl⁻ excretion but also by systemic metabolic acidosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Dec;295(6):C1658-67. Epub 2008 Oct 29.

36. **Hebert SC, Reeves WB, Molony DA, Andreoli TE.** The medullary thick limb: function and modulation of the single-effect multiplier. *Kidney Int.* 1987 Feb;31(2):580-9.
37. **Hick C, Hick A** (2006) *Intesivkurs Physiologie*, 5. komplett überarbeitete Auflage
38. **Himmerkus N, Shan Q, Goerke B, Hou J, Goodenough DA, Bleich M.** Salt and acid-base metabolism in claudin-16 knockdown mice: impact for the pathophysiology of FHHNC patients. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Dec;295(6):F1641-7. Epub 2008 Sep 10.
39. **Hoenderop JG, van Leeuwen JP, van der Eerden BC, Kersten FF, van der Kemp AW, Mérillat AM, Waarsing JH, Rossier BC, Vallon V, Hummler E, Bindels RJ.** Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest.* 2003 Dec;112(12):1906-14.
40. **Hoenderop JG, Müller D, Van Der Kemp AW, Hartog A, Suzuki M, Ishibashi K, Imai M, Sweep F, Willems PH, Van Os CH, Bindels RJ.** Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Jul;12(7):1342-9.
41. **Hou J, Goodenough DA.** Claudin-16 and claudin-19 function in the thick ascending limb. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010 Sep;19(5):483-8.
42. **Hou J, Rajagopal M, Yu AS.,** Claudins and the kidney, *Annu Rev Physiol.* 2013;75:479-501. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183705. Epub 2012 Nov 5. Review.
43. **Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA.** Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 8;106(36):15350-5. Epub 2009 Aug 24.

44. **Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA.** Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):619-28.
45. **Hou J, Shan Q, Wang T, Gomes AS, Yan Q, Paul DL, Bleich M, Goodenough DA.** Transgenic RNAi depletion of claudin-16 and the renal handling of magnesium. *J Biol Chem.* 2007 Jun 8;282(23):17114-22. Epub 2007 Apr 18.
46. **Hulter HN, Sebastian A, Toto RD, Bonner EL Jr, Ilnicki LP** Renal and systemic acid-base effects of the chronic administration of hypercalcemia-producing agents: calcitriol, PTH, and intravenous calcium. *Kidney Int.* 1982 Mar;21(3):445-58.
47. **Van Itallie CM, Anderson JM.** The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. *Proc Am Thorac Soc.* 2004;1(1):38-41.
48. **Karim Z, Szutkowska M, Vernimmen C, Bichara M.** Renal handling of NH₃/NH₄⁺: recent concepts. *Nephron Physiol.* 2005;101(4):p77-81. Epub 2005 Aug 19.
49. **Gheun-Ho Kim, Carolyn A. Ecelbarger, Carter Mitchell, Randall K. Packer, James B. Wade and Mark A. Knepper** Vasopressin increases Na-K-2Cl Cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop, *Am J Physiol Renal Physiol* 276:F96-F103, 1999.
50. **Kim J, Kim YH, Cha JH, Tisher CC, Madsen KM.** Intercalated cell subtypes in connecting tubule and cortical collecting duct of rat and mouse. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Jan;10(1):1-12.
51. **Klinke R, Pape H-C and Silbernagl S (2005):** Physiologie, 5. komplett überarbeitete Auflage
52. **Knoers NV.** Inherited forms of renal hypomagnesemia: an update. *Pediatr Nephrol.* 2009 Apr;24(4):697-705. Epub 2008 Sep 26.

53. **Konrad M, Hou J, Weber S, Dötsch J, Kari JA, Seeman T, Kuwertz-Bröking E, Peco-Antic A, Tasic V, Dittrich K, Alshaya HO, von Vigier RO, Gallati S, Goodenough DA, Schaller A.** CLDN16 genotype predicts renal decline in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2008 Jan;19(1):171-81. Epub 2007 Nov 14.
54. **Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, Vitzthum H, Suzuki Y, Luk JM, Becker C, Schlingmann KP, Schmid M, Rodriguez-Soriano J, Ariceta G, Cano F, Enriquez R, Juppner H, Bakkaloglu SA, Hediger MA, Gallati S, Neuhauss SC, Nurnberg P, Weber S.** Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet.* 2006 Nov;79(5):949-57. Epub 2006 Sep 19.
55. **Kwon, Tae-Hwan, Alexander Pushkin, Natalia Abuladze, Søren Nielsen, and Ira Kurtz,** Immunoelectron microscopic localization of NBC3 sodium-bicarbonate cotransporter in rat kidney, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278: F327–F336, 2000
56. **Lachheb S, Cluzeaud F, Bens M, Genete M, Hibino H, Lourdel S, Kurachi Y, Vandewalle A, Teulon J, Paulais M.** Kir4.1/Kir5.1 channel forms the major K⁺ channel in the basolateral membrane of mouse renal collecting duct principal cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Jun;294(6):F1398-407. Epub 2008 Mar 26.
57. **Leviel F, Hübner CA, Houillier P, Morla L, El Moghrabi S, Brideau G, Hassan H, Parker MD, Kurth I, Kougioumtzes A, Sinning A, Pech V, Riemondy KA, Miller RL, Hummler E, Shull GE, Aronson PS, Doucet A, Wall SM, Chambrey R, Eladari D.** The Na⁺-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na⁺ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice. *J Clin Invest.* 2010 May;120(5):1627-35. doi: 10.1172/JCI40145. Epub 2010 Apr 12.
58. **Li J, Ananthapanyasut W, Yu AS.** Claudins in renal physiology and disease. *Pediatr Nephrol.* 2011 Dec;26(12):2133-42. Epub 2011 Mar 2.

59. **Li XC, Zhuo JL.** Phosphoproteomic analysis of AT1 receptor-mediated signaling responses in proximal tubules of angiotensin II-induced hypertensive rats. *Kidney Int.* 2011 Sep;80(6):620-32.
60. **Lüllmann-Rauch R** (2006) *Histologie*, 2. komplett überarbeitete Auflage
61. **M. Madsen and Søren Nielsen Young-Hee Kim, Tae-Hwan Kwon, Sebastian Frische, Jin Kim, C. Craig Tisher, Kirsten** Immunocytochemical localization of pendrin in intercalated cell subtypes in rat and mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F744–F754, 2002.
62. **Martin JE, Sheaff MT.** Renal ageing, *J Pathol.* 2007 Jan;211(2):198-205.
63. **Milton AE, Weiner ID.** Regulation of B-type intercalated cell apical anion exchange activity by CO₂/HCO₃⁻. *Am J Physiol.* 1998 Jun;274(6 Pt 2):F1086-94.
64. **Nilufar Mohebbi¹, Angelica Perna¹, Jenny van der Wijst, Helen M.** Regulation of Two Renal Chloride Transporters, AE1 and Pendrin, by Electrolytes and Aldosterone, *PLoS ONE* 8(1): e55286. doi:10.1371/journal.pone.0055286
65. **Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S.** Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19;96(2):511-6.
66. **Nijenhuis T, Renkema KY, Hoenderop JG, Bindels RJ.** Acid-base status determines the renal expression of Ca²⁺ and Mg²⁺ transport proteins. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Mar;17(3):617-26. Epub 2006 Jan 18.
67. **Tomohiro Osanai, Takemichi Kanazawa, Yoshiki Yokono, Tsugumichi Uemura, Tomoyuki Okuguchi and Kogo Onodera,** Effect of Aging on Sensitivity of Blood Pressure to Salt, *Jpn J Geriatr* 1993; 30: 30-34.

68. **Patana Teng-umnuay, Jill W. Verlander, Weiping Yuan, C. Craig Tisher, and Kirsten M. Madsen** Identification of Distinct Subpopulations of Intercalated Cells in the Mouse Collecting Duct, *J. Am. Soc. Nephrol.* 1996; 7:260-274
69. **Pech V, Kim YH, Weinstein AM, Everett LA, Pham TD, Wall SM.** Angiotensin II increases chloride absorption in the cortical collecting duct in mice through a pendrin-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Mar;292(3):F914-20. Epub 2006 Oct 31.
70. **Pech V, Pham TD, Hong S, Weinstein AM, Spencer KB, Duke BJ, Walp E, Kim YH, Sutliff RL, Bao HF, Eaton DC, Wall SM.** Pendrin modulates ENaC function by changing luminal HCO₃⁻. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Nov;21(11):1928-41. Epub 2010 Oct 21.
71. **Percy CJ, Power D, Gobe GC.** Renal ageing: changes in the cellular mechanism of energy metabolism and oxidant handling. *Nephrology (Carlton).* 2008 Apr;13(2):147-52.
72. **Praga M, Vara J, González-Parra E, Andrés A, Alamo C, Araque A, Ortiz A, Rodicio JL.** Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney Int.* 1995 May;47(5):1419-25.
73. **Preisser L, Teillet L, Aliotti S, Gobin R, Berthonaud V, Chevalier J, Corman B, Verbavatz JM.** Downregulation of aquaporin-2 and -3 in aging kidney is independent of V(2) vasopressin receptor. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Jul;279(1):F144-52.
74. **Pushkin, Alexander, Natalia Abuladze, Debra Newman, Vladimir Muronets, Pejvak Sassani, Sergei Tatishchev, and Ira Kurtz,** The COOH termini of NBC3 and the 56-kDa H-ATPase subunit are PDZ motifs involved in their interaction, *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C667–C673, 2003
75. **Quarles LD1.,** Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: implications in chronic kidney disease., *Exp Cell Res.* 2012 May 15;318(9):1040-8. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.02.027. Epub 2012 Mar 7.

76. **Quentin F, Chambrey R, Trinh-Trang-Tan MM, Fysekidis M, Cambillau M, Paillard M, Aronson PS, Eladari D.** The Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger pendrin in the rat kidney is regulated in response to chronic alterations in chloride balance. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Dec;287(6):F1179-88. Epub 2004 Aug 3.
77. **Renkema KY, Velic A, Dijkman HB, Verkaart S, van der Kemp AW, Nowik M, Timmermans K, Doucet A, Wagner CA, Bindels RJ, Hoenderop JG.** The calcium-sensing receptor promotes urinary acidification to prevent nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Aug;20(8):1705-13. Epub 2009 May 21.
78. **Schlatter E, Greger R, Schafer JA.** Principal cells of cortical collecting ducts of the rat are not a route of transepithelial Cl⁻ transport. *Pflugers Arch.* 1990 Nov; 417(3): 317-23.
79. **Schmitt R, Cantley LG.** The impact of aging on kidney repair. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Jun;294(6):F1265-72
80. **Schneeberger EE, Lynch RD.** The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Jun;286(6):C1213-28.
81. **V L Schuster, J P Kokko, and H R Jacobson** Angiotensin II directly stimulates sodium transport in rabbit proximal convoluted tubules. *J Clin Invest.* 1984 February; 73(2): 507–515.
82. **George J. Schwartz, Shuichi Tsuruoka, Soundarapandian Vijayakumar, Snezana Petrovic, Ayesa Mian, and Qais Al-Awqati,** Acid incubation reverses the polarity of intercalated cell transporters, an effect mediated by hensin, *J Clin Invest.* 2002 Jan;109(1):89-99.
83. **Shan Q, Himmerkus N, Hou J, Goodenough DA, Bleich M** Insights into driving forces and paracellular permeability from claudin-16 knockdown mouse. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 May;1165:148-51.

84. **Silver RB, Breton S, Brown D.** Potassium depletion increases proton pump (H(+)-ATPase) activity in intercalated cells of cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Jul;279(1):F195-202.
85. **Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP.** Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science.* 1999 Jul 2;285(5424):103-6.
86. **Stegbauer J, Gurley SB, Sparks MA, Woznowski M, Kohan DE, Yan M, Lehrich RW, Coffman TM.** AT1 receptors in the collecting duct directly modulate the concentration of urine. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Dec; 22(12):2237-46
87. **Tararhuch AL, Fernandez R, Ramirez MA, Malnic G.** Factors affecting ammonium uptake by C11 clone of MDCK cells. *Pflugers Arch.* 2002 Nov;445(2):194-201. Epub 2002 Sep 11.
88. **Uchida S.** In vivo role of CLC chloride channels in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Nov;279(5):F802-8.
89. **Valles P, Lapointe MS, Wysocki J, Batlle D.** Kidney vacuolar H⁺ -ATPase: physiology and regulation. *Semin Nephrol.* 2006 Sep;26(5):361- 74.
90. **Verlander JW, Hassell KA, Royaux IE, Glapion DM, Wang ME, Everett LA, Green ED, Wall SM.** Deoxycorticosterone upregulates PDS (Slc26a4) in mouse kidney: role of pendrin in mineralocorticoid-induced hypertension. *Hypertension.* 2003 Sep;42(3):356-62. Epub 2003 Aug 18.
91. **Verlander JW, Kim YH, Shin W, Pham TD, Hassell KA, Beierwaltes WH, Green ED, Everett L, Matthews SW, Wall SM.** Dietary Cl⁻ restriction upregulates pendrin expression within the apical plasma membrane of type B intercalated cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F833–F839, 2006.

92. **Wagner CA, Finberg KE, Stehberger PA, Lifton RP, Giebisch GH, Aronson PS, Geibel JP.** Regulation of the expression of the Cl⁻/anion exchanger pendrin in mouse kidney by acid-base status. *Kidney Int.* 2002 Dec;62(6):2109-17.
93. **Wagner CA, Devuyst O, Bourgeois S, Mohebbi N.** Regulated acid-base transport in the collecting duct. *Pflugers Arch.* 2009 May;458(1):137-56. Epub 2009 Mar 7.
94. **Wall SM, Hassell KA, Royaux IE, Green ED, Chang JY, Shipley GL, Verlander JW.** Localization of pendrin in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Jan;284(1):F229-41. Epub 2002 Aug 27.
95. **Wall SM, Kim YH, Stanley L, Glapion DM, Everett LA, Green ED, Verlander JW.** NaCl restriction upregulates renal Slc26a4 through subcellular redistribution: role in Cl⁻ conservation. *Hypertension* 44: 982–987, 2004.
96. **Wall SM, Sands JM, Flessner MF, Nonoguchi H, Spring KR, Knepper MA.** Net acid transport by isolated perfused inner medullary collecting ducts. *Am J Physiol.* 1990 Jan;258(1 Pt 2):F75-84.
97. **Wang W, Praetorius J, Li C, Praetorius HA, Kwon TH, Frøkiaer J, Nielsen S.** Vacuolar H⁺-ATPase expression is increased in acid-secreting intercalated cells in kidneys of rats with hypercalcaemia-induced alkalosis. *Acta Physiol (Oxf).* 2007 Apr;189(4):359-68.
98. **Weber S, Schlingmann KP, Peters M, Nejsum LN, Nielsen S, Engel H, Grzeschik KH, Seyberth HW, Gröne HJ, Nüsing R, Konrad M.** Primary gene structure and expression studies of rodent paracellin-1. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Dec;12(12):2664-72.
99. **Weber S, Schneider L, Peters M, Misselwitz J, Rönnefarth G, Böswald M, Bonzel KE, Seeman T, Suláková T, Kuwertz-Bröking E, Gregoric A, Palcoux JB, Tasic V, Manz F, Schärer K, Seyberth HW, Konrad M.** Novel paracellin-1 mutations in

- 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Sep;12(9):1872-81.
100. **Weiner ID, Weill AE, New AR.** Distribution of Cl⁻/HCO₃⁻ exchange and intercalated cells in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol*. 1994 Dec;267(6 Pt 2):F952-64.
101. **Will C, Breiderhoff T, Thumfart J, Stuiver M, Kopplin K, Sommer K, Günzel D, Querfeld U, Meij IC, Shan Q, Bleich M, Willnow TE, Müller D.** Targeted deletion of murine *Cldn16* identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca²⁺ and Mg²⁺ wasting. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Feb 10. [Epub ahead of print]
102. **Xi Q, Hoenderop JG, Bindels RJ.** Regulation of magnesium reabsorption in DCT. *Pflugers Arch*. 2009 May;458(1):89-98. Epub 2008 Oct 24.
103. **Yamaji Y, Hayashi M, Iyori M, Kitajima W, Saruta T.** Chronic DOC treatment enhances Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger activity of beta-intercalated cells in rabbit CCD. *Am J Physiol*. 1992 May;262(5 Pt 2):F712-7.
104. **Yeh BI, Sun TJ, Lee JZ, Chen HH, Huang CL:** Mechanism and molecular determinant for regulation of rabbit transient receptor Potential type 5 (TRPV5) channel by extracellular pH. *J Biol Chem* 278 : 51044 –51052, 2003
105. **Yip KP, Kurtz I.** NH₃ permeability of principal cells and intercalated cells measured by confocal fluorescence imaging. *Am J Physiol*. 1995 Oct;269(4 Pt 2):F545-50.
106. **Yu AS, Cheng MH, Angelow S, Günzel D, Kanzawa SA, Schneeberger EE, Fromm M, Coalson RD.** Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J Gen Physiol*. 2009 Jan;133(1):111-27.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Epithels.....	8
Abbildung 2: Nernst-Gleichung	9
Abbildung 3: Transzellulärer Transport	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Epithels.....	11
Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Nephrons:	12
Abbildung 6: Transportsysteme der TAL	13
Abbildung 7: Transportsysteme des DCT	15
Abbildung 8: Transportsysteme der Hauptzelle des Sammelrohres	16
Abbildung 9: Transportsysteme der Typ-A/B-Schaltzellen des Sammelrohres	17
Abbildung 10: Transportsysteme der Non-A-Non-B-Schaltzelle im Sammelrohr	18
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Knockdowns von Claudin-16 in der TAL.....	19
Abbildung 12: Übersicht über die Steuerhormone des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes.....	21
Abbildung 13: Regulation des Calciumhaushaltes.....	23
Abbildung 14: Formel zur BMI-Berechnung.....	37
Abbildung 15: Formel zur Normierung auf Kreatinin	39
Abbildung 16: Formel zur Berechnung der Fraktionellen Exkretion	39
Abbildung 17: Messung des Oberschenkelknochens.....	40
Abbildung 18: Prinzip der indirekten Fluoreszenz-Immunhistochemie	43
Abbildung 19: Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen.....	46
Abbildung 20: Schematische Darstellung des Perfusionssystems	50
Abbildung 21: Formel zur Berechnung des transepithelialen Widerstandes	50
Abbildung 22: Formel zur Berechnung der Längskonstante	51
Abbildung 23: Formel zur Berechnung des Kurzschlußstromes	51
Abbildung 24: Tubulusperfusion	52
Abbildung 25: Perfusion isolierter Sammelrohre.....	52
Abbildung 26: Exponentialfunktionen zur Änderung des Fluoreszenzquotienten	53
Abbildung 27: Näherungsfunktion durch Meßpunkte einer pH Änderung.....	53
Abbildung 28: Gewichts- und Größenparameter der Versuchstiere	56
Abbildung 29: Magnesiumparameter	56
Abbildung 30: Calciumparameter	57
Abbildung 31: Phosphatparameter	58
Abbildung 32: Hämatokrit und Osmolalitäten	60

Abbildung 33: Plasmakonzentrationen von Harnstoff und Kreatinin	61
Abbildung 34: Altersverteilung der Urin-pH-Werte	63
Abbildung 35: Makroskopische Morphologie	64
Abbildung 36: Mikroskopische Tubulummorphologie	65
Abbildung 37: Pendrin in isolierten Tubuli und in Kryoschnitten	66
Abbildung 38: vH^+ -ATPase in isolierten Tubuli und in Kryoschnitten	67
Abbildung 39: Westernblot und Gesamtproteinmenge für Pendrin und vH^+ -ATPase	68
Abbildung 40: AE1 in isolierten Tubuli und in Kryoschnitten	69
Abbildung 41: vH^+ -ATPase in medullären Kryoschnitten	70
Abbildung 42: β -ENaC in isolierten Tubuli und in Kryoschnitten	71
Abbildung 43: AQP2 in Kryoschnitten	72
Abbildung 44: TRPV5 in Kryoschnitten	73
Abbildung 45: NKCC2 in isolierten Tubuli und in Kryoschnitten	74
Abbildung 46: $[pH]_i$ unter extrazellulärer Belastung mit Ammonium	75
Abbildung 47: $[pH]_i$ unter Belastung mit Ammonium unter Zugabe von Bariumchlorid	76
Abbildung 48: Natriumabhängige $[pH]_i$ -Regulation	77
Abbildung 49: Durchführung Schaltzell-spezifische $[pH]_i$ -Regulation	78
Abbildung 50: Ergebnisse Schaltzell-spezifische $[pH]_i$ -Regulation	79
Abbildung 51: Kurzschlussströme	80
Abbildung 52: Transportvorgänge an isoliert perfundierten Tubuli	90

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Knochenparameter	59
Tabelle 2: Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid	60
Tabelle 3: Tubuläre Parameter für Natrium, Kalium und Chlorid	62
Tabelle 4: Säure-Base-Parameter im Plasma	63

7 Lebenslauf

Jan-Eike Behrends

Anschrift	Mittelweg 36d 26127 Oldenburg Deutschland
Geburtsdatum/-ort	06.09.1985 in Wildeshausen
Familienstand	Ledig
Konfession	Evangelisch

Schullaufbahn

1992 - 1996	Grundschule in Dötlingen
1996 - 1998	Orientierungsstufe in Wildeshausen
1998 - 2005	Gymnasium Wildeshausen Abiturnote 1,5

Praktische Erfahrungen

07/2005 - 04/2006	Grundwehrdienst im Sanitätszentrum der Führungsakademie der Bundeswehr in Hamburg
04/2006 – 07/2006	Anschlußwehrübung im Sanitätszentrum der Führungsakademie der Bundeswehr in Hambur
08/2006 – 09/2006	Praktikum Chirurgische Gemeinschaftspraxis Schönbrodt/Stöver in Wildeshausen

Studium

ab 10/2006	Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
08/2008	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
12/2012	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0

Arbeit

Seit 04/2013	Assistenzarzt für Innere Medizin in der Ammerlandklinik Westerstede GmbH
--------------	---

Famulaturen

Innere Medizin:	Krankenhaus Johanneum Wildeshausen (2010)
Chirurgie:	Krankenhaus Johanneum Wildeshausen (2009)
Urologie:	Universitätsklinikum Kiel, Klinik für Urologie und Kinderurologie (2011)
Allgemeinmedizin:	Sanitätszentrum der Führungsakademie der Bundeswehr in Hamburg (im Rahmen einer Wehrübung 2009) Sanitätszentrum der Führungsakademie der Bundeswehr in Hamburg (im Rahmen einer Wehrübung 2010)

Praktisches Jahr

Urologie:	Universitätsklinikum Kiel, Klinik für Urologie und Kinderurologie (2011/2012)
Chirurgie:	Städtisches Krankenhaus Kiel, Chirurgische Klinik (2011)
Innere Medizin:	Klinikverbund Flensburg, Medizinische Klinik (2012)

Wissenschaftliche Laufbahn

2009-2012	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Christian-Albrechts-Universität Kiel;
03/2011	Teilnahme und Postervortrag am „90th Annual Meeting der Deutschen Physiologischen Gesellschaft“, Regensburg
05/2011	Vortrag auf dem „XVI. Treffen der Ostseephysiologen“, Kiel

8 Publikationsliste

8.1 Vorträge und Poster

BEHRENDTS J. E., HIMMERKUS N., BLEICH M. Localization of acid-base transport proteins in cortical collecting duct of Claudin-16 knockdown mice,

XVI. Treffen der Ostseephysiologen, Kiel (2011); Vortrag

HIMMERKUS N., BEHRENDTS J. E., BLEICH M. Acid-base and electrolyte transport in cortical collecting duct of Claudin-16 knockdown mice, 90th Annual Meeting der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Regensburg (2011); Poster

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig verfasst wurde und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt wurden. Die Stellen der Arbeit, einschließlich Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht. Diese Dissertation hat noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen und wurde, abgesehen von oben angegebenen Teilpublikationen, noch nicht veröffentlicht. Eine solche Veröffentlichung werde ich auch nicht vor Abschluss des Promotionsverfahrens vornehmen. Die Bestimmungen der Promotionsordnungen sind mir bekannt.

Kiel, den 29.02.2015

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Dr. Nina Himmerkus sowie Herrn Prof. Dr. Markus Bleich für die hervorragende Betreuung und Anleitung während der Zeit als Doktorand danken. Eine derart engmaschige und qualitativ hochwertige Begleitung eines Doktoranten hat sicherlich seltenheitswert. Das Durchführen und Diskutieren wissenschaftlicher Experimente sowie das Bewerten und kritische Lesen von Fachliteratur sind Fähigkeiten, die mir bereits jetzt im Berufsleben deutlich zugutekamen. Trotz vieler „Verdammt’s“ während der Versuchsdurchführung hat es mir insgesamt auch sehr viel Spaß gemacht.

Weiterhin möchte ich mich bei dem gesamten Team der Physiologie Kiel für die angenehme Zeit und die kollektive Zusammenarbeit bedanken, in der ich kompetent an die Arbeit in einem wissenschaftlichen Betrieb herangeführt wurde.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Großeltern, für das in mich gesetzte Vertrauen sowie die Zuwendungen, die mir das Studium und auch die Promotion ermöglicht haben.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Freunden für die moralische Unterstützung und vor allem für die vielfältigen großen und kleinen Ablenkungen während der Promotionsarbeit meinen Dank aussprechen.