

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

**TIGHT JUNCTION MUSTER**  
**&**  
**EINFLUSS VERSCHIEDENER SALZBELASTUNGEN**  
**AUF CLAUDINE DER MURINEN NIERE**

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

vorgelegt von

**VERA CHRISTINE WULFMEYER**  
aus Mannheim

Kiel 2016

1. Berichterstatter:  
2. Berichterstatter:  
Tag der mündlichen Prüfung:  
Zum Druck genehmigt, Kiel, den

Prof. Dr. med. Markus Bleich  
Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius  
07.02.2017  
20.09.2016  
gez.: Prof. Dr. med. Johann Roider  
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Nierenfunktion	7
1.1.1 Histologie der Niere	7
1.1.2 Funktion der Niere	8
1.2 Kalzium-, Magnesium- und Phosphathomöostase	8
1.2.1 Kalziumhomöostase	8
1.2.1.1 Aufgaben der Niere im Rahmen der Kalziumhomöostase	10
1.2.2 Magnesiumhomöostase	12
1.2.2.1 Aufgaben der Niere im Rahmen der Magnesiumhomöostase	13
1.3 Tight Junctions und Claudine	13
1.3.1 Tight Junctions	13
1.3.2 Claudine	14
1.3.3 Claudine in der murinen Niere	15
1.3.3.1 Claudin 16	16
1.3.3.2 Claudin 19	17
1.3.3.3 Claudin 14	18
1.3.3.4 Claudin 10	18
1.4 Fragestellung	20
<b>2. Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Materialien	21
2.2 Versuchstiere	21
2.2.1 Diäten	21
2.3 Erhebung der metabolischen Daten	22
2.3.1 Berechnung der normalisierten Urinparameter	22
2.3.2 Berechnung der Konzentration der Osmolyte im Urin	22
2.3.3 Berechnung der fraktionellen Exkretionen	23
2.4 Enzymatische Tubuluspräparation	23
2.5 Real time RT-PCR	25
2.5.1 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	25
2.5.2 Durchführung und Auswertung der real time RT-PCR	25
2.5.2.1 Auswahl der Primerpaare	25
2.5.2.2 Real time RT-PCR der TAL der Kalziumdiättiere	26
2.5.2.3 Datenanalyse	27
2.5.2.4 Weitere Qualitätskontrolle der PCR Ergebnisse	30
2.5.2.5 Effizienzbestimmung	31
2.5.2.6 Darstellung der Daten	33
2.5.2.7 Real time RT-PCR der TAL der Magnesiumdiättiere	33
2.6 Western Blot	34
2.6.1 Lösungen für die Nierenaufarbeitung und den Western Blot	34
2.6.2 Probengewinnung	36
2.6.2.1 Gewinnung der TAL Proben	36
2.6.2.2 Gewinnung der Gesamtnierenprobe	36
2.6.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration der Gesamtnierenprobe	37

2.6.3	Gelelektrophorese und Transfer auf Membran .....	37
2.6.4	Auswertung .....	39
2.7	Immunfluoreszenzfärbungen .....	40
2.7.1	Antikörper und Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbungen .....	40
2.7.2	Entnahme der Nieren .....	43
2.7.2.1	<i>PFA perfusionsfixierte Nieren</i> .....	43
2.7.2.2	<i>Unfixierte Nieren</i> .....	43
2.7.3	Färbevorgang.....	43
2.7.3.1	<i>PFA perfusionsfixierte Nieren</i> .....	44
2.7.3.2	<i>Unfixierte Nieren</i> .....	44
2.7.4	Auswertung .....	45
2.7.4.1	<i>Zählung Claudin 10 gefärbter Zellen in TAL</i> .....	45
2.7.5	Negativkontrollen ohne Erstantikörper .....	46
2.8	Statistik.....	48
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
3.1	Elektrolythaushalt unter veränderter Kalzium- und Magnesiumzufuhr .....	49
3.1.1	Veränderte Kalziumzufuhr .....	49
3.1.1.1	<i>Auswirkungen der Niedrigkalziumdiät</i> .....	50
3.1.1.2	<i>Auswirkungen der Hochkalziumdiät</i> .....	51
3.1.2	Veränderte Magnesiumzufuhr .....	51
3.1.2.1	<i>Auswirkungen der Niedrigmagnesiumdiät</i> .....	53
3.1.2.2	<i>Auswirkungen der Hochmagnesiumdiät</i> .....	53
3.2	Claudin Expression in der TAL unter den verschiedenen diätetischen Bedingungen .....	54
3.2.1	Einfluss der oralen Kalziumaufnahme auf die Claudin mRNA Expression in der TAL ...	54
3.2.2	Einfluss der oralen Magnesiumaufnahme auf die Claudin mRNA Expression in der TAL. .....	55
3.3	Claudin 10 Western Blots aus TAL von Kalziumdiättieren .....	57
3.4	Lokalisation der Claudine entlang des Nephrons.....	58
3.4.1	Muster der TJ entlang des Nephrons .....	58
3.4.2	Vorkommen und Verteilung verschiedener Claudine in der murinen Niere .....	60
3.4.2.1	<i>Claudin 2</i> .....	60
3.4.2.2	<i>Claudin 10</i> .....	61
3.4.2.3	<i>Claudin 14</i> .....	63
3.4.2.4	<i>Claudin 16</i> .....	64
3.4.2.5	<i>Claudin 19</i> .....	65
3.4.2.6	<i>Zytosolisches Färbungsmuster der TAL</i> .....	68
3.4.2.7	<i>Schematische Übersicht der IF Ergebnisse</i> .....	69
3.4.3	Claudindoppelfärbungen.....	69
3.4.4	Diätspezifische Ergebnisse der Färbungen in der TAL.....	71
3.4.4.1	<i>Claudin 10</i> .....	71
3.4.4.2	<i>Anzahl Claudin 10 gefärbter Zellen in TAL aus Kortex und OSOM</i> .....	72
3.4.4.3	<i>Claudin 14</i> .....	73
3.4.4.4	<i>Claudin 16 und 19</i> .....	75
3.4.5	Diätspezifische Ergebnisse der Färbungen in anderen Abschnitten der Niere .....	75
3.4.5.1	<i>Claudin 10 im proximalen Tubulus</i> .....	75
3.4.5.2	<i>Claudin 19 im distalen Konvolut</i> .....	77
3.4.5.3	<i>Claudin 14 im Sammelrohr</i> .....	78

3.4.5.4	<i>Claudin 19 im Sammelrohr</i> .....	80
3.4.6	Tabellarische Übersicht der diätetisch veränderten Claudin 10, 14, 16 und 19 Expression .....	82
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>83</b>
4.1	Methoden.....	83
4.1.1	Versuchstiere.....	83
4.1.2	Auswahl der unter den verschiedenen Diätbedingungen untersuchten Claudine .....	83
4.1.3	Real time RT-PCR.....	83
4.1.4	Western Blot.....	84
4.1.5	Immunfluoreszenzfärbungen .....	84
4.1.5.1	<i>Veränderte junctionale Claudinexpression</i> .....	84
4.1.5.2	<i>Claudin 10</i> .....	85
4.1.6	Posttranslationale Modifikationen .....	85
4.2	Ergebnisse .....	85
4.2.1	Morphologie der TJ entlang des Nephrons .....	85
4.2.2	Verteilung von Claudin 2, 10, 14, 16, 19 entlang des Nephrons .....	86
4.2.2.1	<i>Claudin 2</i> .....	86
4.2.2.2	<i>Claudin 10</i> .....	86
4.2.2.3	<i>Claudin 14</i> .....	88
4.2.2.4	<i>Claudin 16</i> .....	88
4.2.2.5	<i>Claudin 19</i> .....	89
4.2.3	Claudindoppelfärbungen und junctionale Koloalitionen.....	90
4.2.4	Effekte einer veränderten oralen Kalziumzufuhr .....	90
4.2.4.1	<i>Auswirkungen der Kalziumdiäten auf den Organismus</i> .....	91
4.2.4.2	<i>Expressionsanalysen der Kalziumdiättiere in Bezug auf die TAL</i> .....	92
4.2.4.3	<i>Befunde aus anderen Nephronabschnitten</i> .....	95
4.2.5	Effekte einer veränderten oralen Magnesiumzufuhr.....	96
4.2.5.1	<i>Auswirkungen der Magnesiumdiäten auf den Organismus</i> .....	96
4.2.5.2	<i>Expressionsanalysen der Magnesiumdiättiere in Bezug auf die TAL</i> .....	97
4.2.5.3	<i>Befunde aus anderen Nephronabschnitten</i> .....	99
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>101</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>110</b>
7.1	Zusammensetzung des Futters.....	110
7.2	Tierversuchsantrag .....	110
	<b>Danksagung</b> .....	<b>111</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>112</b>

## Glossar

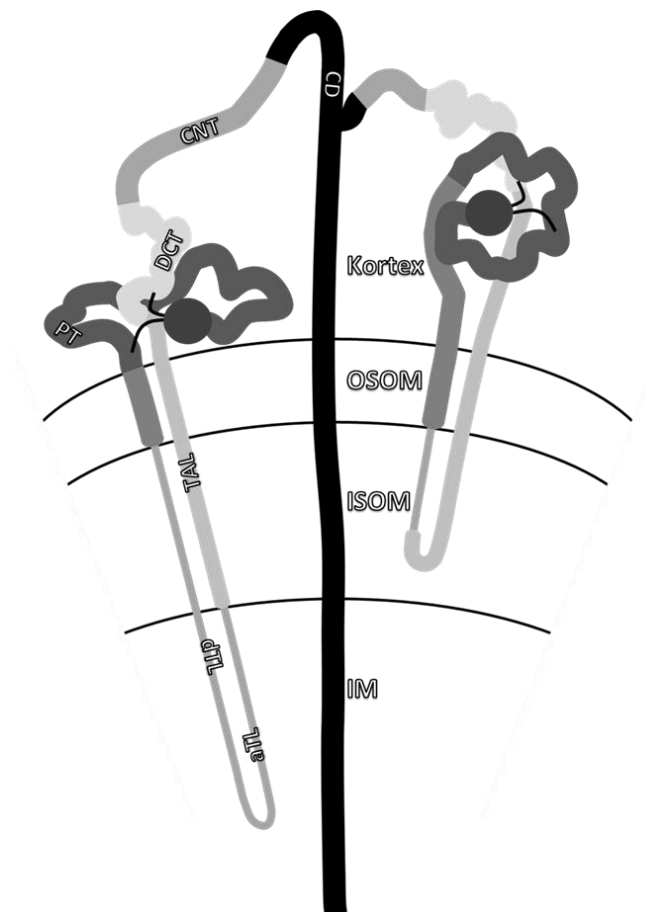
aTL	ascending thin limb = dünne aufsteigende Henle-Schleife
ATPase	Adenosintriphosphat-getriebene Pumpe
BSA	bovines Serumalbumin
CaSR	calcium sensing receptor = Kalzium-sensitiver Rezeptor
CD	collecting duct = Sammelrohr
cDNA	complementary DNA = komplementäre DNA
CNT	connecting tubule = Verbindungstubulus
Ct	cycle threshold = Schwellenwertzyklus
cTAL	cortical thick ascending limb = kortikale dicke aufsteigende Henle-Schleife
DCT	distal convoluted tubule = distales Konvolut
dTL	descending thin limb = dünne absteigende Henle-Schleife
FE	fraktionelle Exkretion
FHHNC	familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalzurie und Nephrokalzinose
IM	inner medulla = inneres Mark
ISOM	inner stripe of outer medulla = Innenstreifen des äußeren Marks
IZ	intrazellulär
KO	knock out
NKCC2	Natrium-Kalium-2-Chlorid-Kotransporter Unterform 2
OSOM	outer stripe of outer medulla = Außenstreifen des äußeren Marks
PBS	phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Salzlösung
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PFA	Paraformaldehyd
PT	proximal tubule = proximaler Tubulus
PTH	Parathyrin = Parathormon
ROMK	renal outer medullary potassium channel = Kaliumkanal des äußeren Nierenmarks
RT	reverse transcriptase = Reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse transcription-PCR = reverse Transkription – PCR
SEM	standard error of the mean
TAL	thick ascending limb = dicke aufsteigende Henle-Schleife
TJ	tight junction = Schlussleiste
TL	thin limb = dünne Schleife
TRPV5	transient receptor potential cation channel subfamily V member 5 = epithelialer Kalziumkanal
TRPM6	transient receptor potential cation channel subfamily M member 6
WB	Western Blot
WT	wild type = Wildtyp

# 1. Einleitung

## 1.1 Nierenfunktion

### 1.1.1 Histologie der Niere

Die Nieren der Maus bestehen jeweils aus in etwa 13000 Nephronen (18). Dabei werden verschiedene Arten von Nephronen unterschieden: Zum einen juxtamedulläre Nephronen, die etwa 18 % aller Nephronen der Niere ausmachen und deren Scheitelpunkte der Henle-Schleifen im inneren Mark liegen. Auf der anderen Seite besteht die Niere aus oberflächlichen Nephronen (etwa 82 % aller Nephronen (88)), die bis in unterschiedliche Tiefen des Innenstreifens des äußeren Marks reichen (Abbildung 1). Bei letzteren geht die dünne absteigende Henle-Schleife (dTL) direkt in die dicke aufsteigende Henle-Schleife (TAL) über.

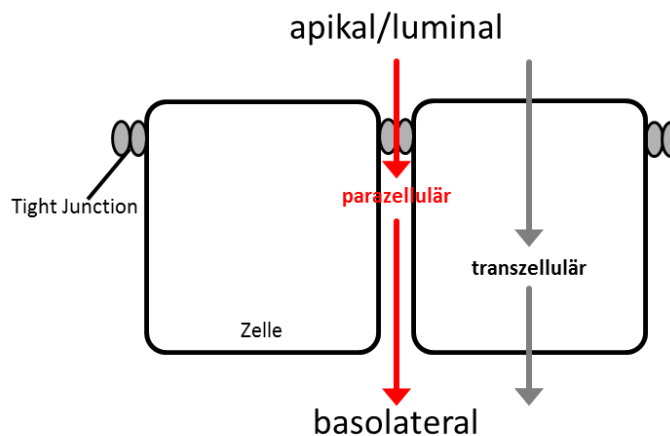


**Abbildung 1** Schematische Nephrondarstellung mit juxtamedullärem (links) und oberflächlichem (rechts) Nephron. OSOM = outer stripe of outer medulla = Außenstreifen des äußeren Marks, ISOM = inner stripe of outer medulla = Innenstreifen des äußeren Marks, IM = inner medulla = inneres Mark. PT = proximal tubule = proximaler Tubulus, dTL = descending thin limb = dünne absteigende Henle-Schleife, aTL = ascending thin limb = dünne aufsteigende Henle-Schleife, TAL = thick ascending limb = dicke aufsteigende Henle-Schleife, DCT = distal convoluted tubule = distales Konvolut, CNT = connecting tubule = Verbindungstubulus, CD = collecting duct = Sammelrohr.

In der murinen Niere konnten im Gegensatz zu anderen Säugern keine Nephrone gefunden werden, die ausschließlich im Kortex lokalisiert sind (88). Die verschiedenen Nephronabschnitte bestehen aus Epithelien mit unterschiedlichen Transporteigenschaften.

### 1.1.2 Funktion der Niere

Die Niere nimmt u. a. eine herausragende Rolle in der Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase des Organismus ein. Hierzu transportieren die unterschiedlich spezialisierten Epithelien der verschiedenen Nephronabschnitte die Inhaltsstoffe des im Glomerulum filtrierten Primärharns sowohl aus dem Tubuluslumen ins Blut (Reabsorption) als auch vom Blut ins Tubuluslumen (Sekretion). Diese Transportvorgänge finden sowohl transzellulär statt, d. h. durch die Zellen hindurch, als auch parazellulär, d. h. durch die Tight Junction (TJ), jedoch an den Zellen vorbei (Abbildung 2) (52, 73).



**Abbildung 2** Schematische Darstellung zweier Zellen, ihrer Tight Junction, sowie der para- und transzellulären Reabsorption. Apikal/luminal = Harnseite. Basolateral = Blutseite.

Trans- und parazelluläre Transportvorgänge bestimmen die mit dem Urin ausgeschiedene Menge der im Urin befindlichen Substanzen. Die fraktionelle Exkretion (FE) beschreibt die Menge einer ausgeschiedenen Substanz in Relation zur glomerulären Filtrationsrate und spiegelt damit als tubulärer Funktionsparameter die tubuläre Transportfunktion der Nieren wider.

## 1.2 Kalzium-, Magnesium- und Phosphathomöostase

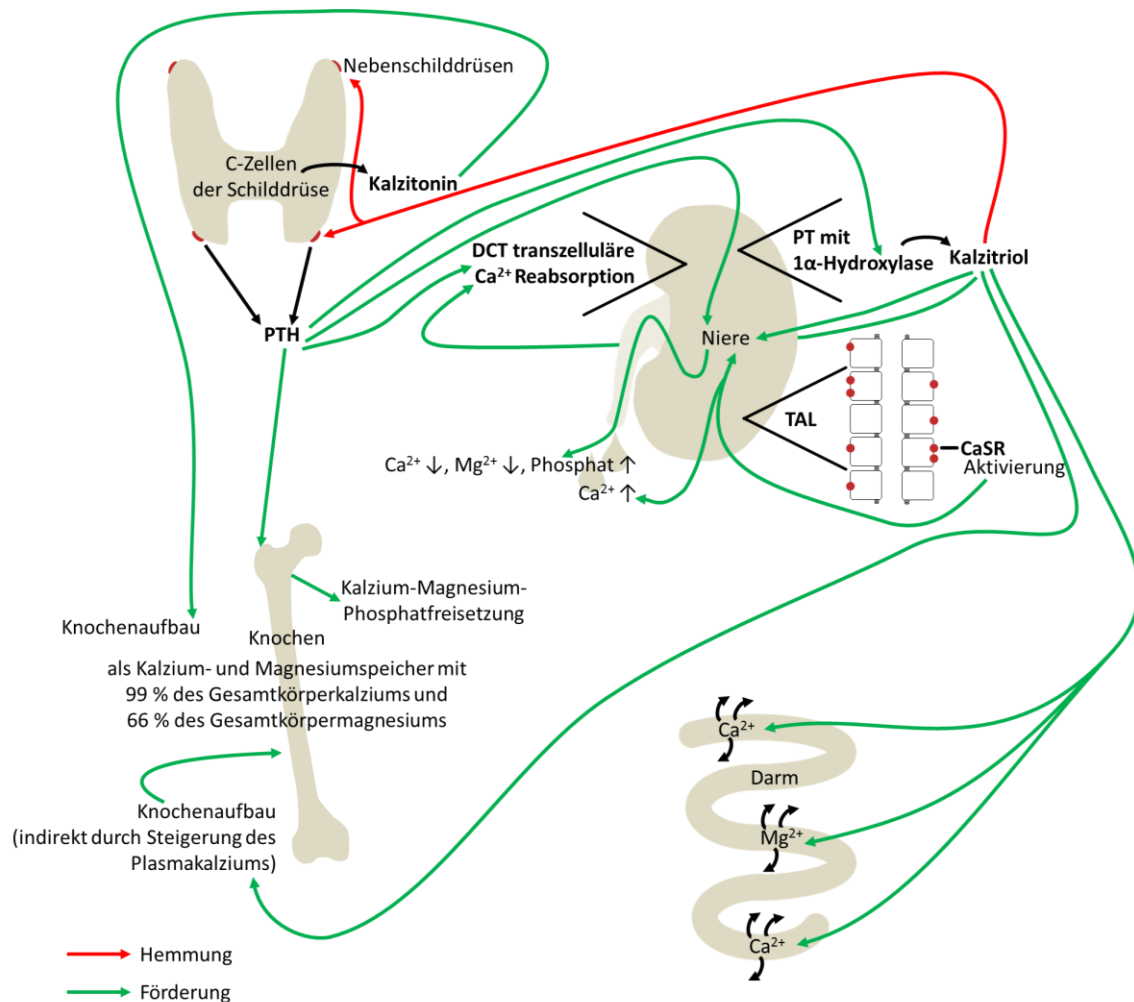
### 1.2.1 Kalziumhomöostase

Kalzium dient dem Organismus als Baustein zur Knochen- und Zahnbildung. Des Weiteren ist es essenzieller Kofaktor der Blutgerinnung und beteiligt an der Muskelkontraktion von glatter sowie Skelett- und Herzmuskulatur. Auf zellulärer Ebene dient Kalzium außerdem der Stabilisierung des Membranpotentials und ist für die Plateauphase des Aktionspotentials der Herzmuskelzelle



verantwortlich. Ferner vermittelt Kalzium die Transmitterfreisetzung präsynaptischer Neurone und dient auch der intrazellulären Signaltransduktion als Botenstoff. Diese Funktionen beruhen auf zellulärer Ebene insbesondere auf dem mindestens tausend- bis zehntausendfachen Konzentrationsunterschied von Kalzium zwischen extra- und intrazellulärer Flüssigkeit. Zur Aufrechterhaltung dieses Konzentrationsunterschieds und der verschiedenen Funktionen ist daher eine enge Regulation des Kalziumhaushaltes unerlässlich.

Die Kalziumhomöostase beruht auf dem Zusammenspiel des Darms, der Nieren sowie der Knochen als größter Kalziumspeicher des Körpers (Abbildung 3). Dieses Zusammenspiel wird durch die Hormone Parathyrin (PTH) und Kalzitriol sowie Kalzitonin beeinflusst. Außerdem spielt der Kalzium-sensitive Rezeptor (CaSR) eine entscheidende Rolle in der Regulation des Kalziumhaushaltes.



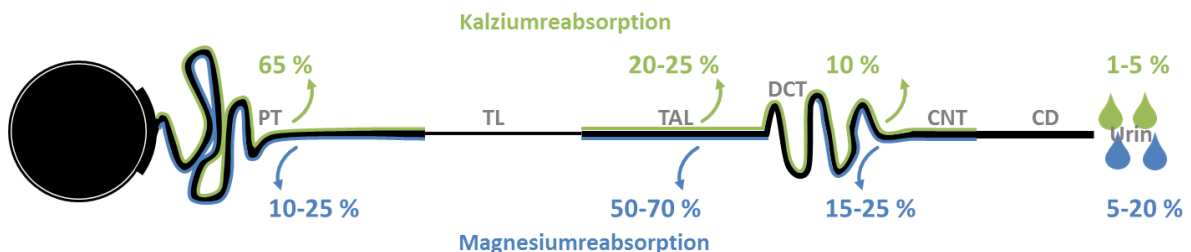
**Abbildung 3** Übersicht der an der Kalzium-Magnesium-Phosphathomöostase beteiligten Komponenten und deren gegenseitigen Beeinflussung. Auf Grund der kontrovers diskutierten Wirkung von Kalzitonin (52, 73) auf die Niere, wurde diese nicht in die Abbildung eingeschlossen.

Sinkt die Plasmakalziumkonzentration unter einen gewissen Grenzwert ab, spricht man von einer Hypokalzämie. Die Mechanismen zur Bekämpfung einer Hypokalzämie ähneln sich bei Menschen und

Mäusen. Sowohl eine vermehrte PTH-Ausschüttung als auch eine direkte Stimulierung der Kalzitriolsynthese sorgen im gesunden Organismus für einen Ausgleich der Hypokalzämie. Die meisten Hypokalzämien beruhen allerdings auf Störungen der PTH- und Kalzitriolwirkung. Nur wenige andere, wie z. B. eine verminderte orale Kalziumaufnahme, osteoblastische Knochentumore und die akute Pankreatitis, führen ohne Störungen der hormonellen Regulation zur Hypokalzämie (10).

Auch eine erhöhte Plasmakalziumkonzentration (Hyperkalzämie) geht meistens aus einer Störung der PTH-, Kalzitriolregulation oder der Nierenfunktion hervor. Zusätzlich können eine übermäßige orale Kalziumaufnahme, Immobilisierung, osteolytische Knochenmetastasen und die Thyreotoxikose, auch ohne Pathologien dieser Regulationsmechanismen, zur Hyperkalzämie führen (10). Im Rahmen einer Hyperkalzämie tragen beim erwachsenen Menschen v. a. die Senkung der PTH-Ausschüttung und eine verminderte Kalzitriolsynthese sowie die direkte Wirkung des Kalziums auf den CaSR der kortikalen dicken aufsteigenden Henle-Schleife (cTAL) zur Normalisierung der Plasmakalziumkonzentration bei (11). Die Wichtigkeit des Kalzitons wird in Mensch und Nagetier unterschiedlich beurteilt. In der Literatur wird der Wirkung von Kalzitoin im erwachsenen Menschen eine untergeordnete Rolle in Bezug auf die Regulationsvorgänge bei Hyperkalzämien zugeordnet (11). Im Gegensatz dazu wird der Wirkung von Kalzitoin in Nagetieren eine größere Rolle beigemessen (67). Im Zustand der Hyperkalzämie sind die wichtigsten an der Kalziumhomöostase beteiligten Faktoren bei Mäusen Kalzitoin sowie die direkte kalziurische Wirkung des Kalziums durch Aktivierung des CaSR der cTAL (11). Allerdings zeigt eine Untersuchung, die das Alter der Nagetiere berücksichtigt, für Kalzitoingabe bei drei Monate alten Ratten einen hypokalzämischen Effekt, jedoch nicht bei zwölf bis 14 Monate und 22 bis 24 Monate alten Ratten (5).

#### 1.2.1.1 Aufgaben der Niere im Rahmen der Kalziumhomöostase

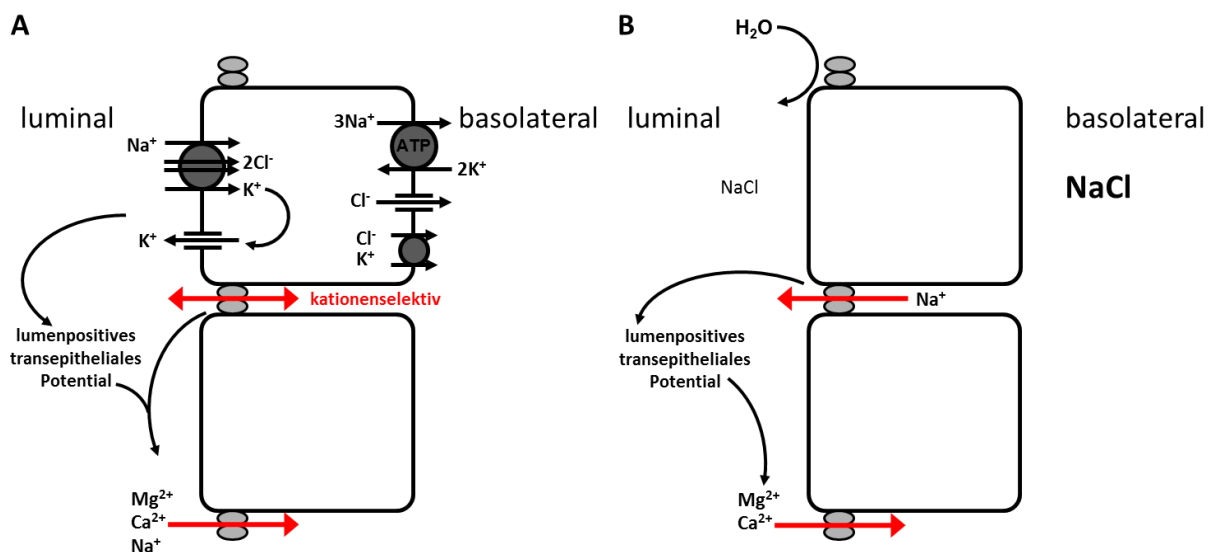


**Abbildung 4** Darstellung der anteiligen Reabsorption von Kalzium und Magnesium in den verschiedenen Nephronabschnitten. PT = proximal tubule = proximaler Tubulus, TL = thin limb = dünne Schleife, TAL = thick ascending limb = dicke aufsteigende Henle-Schleife, DCT = distal convoluted tubule = distales Konvolut, CNT = connecting tubule = Verbindungstubulus, CD = collecting duct = Sammelrohr. Die Quellenangaben für die Prozentangaben finden sich in Kapitel 1.2.1.1 und 1.2.2.1.

Im späten proximalen Tubulus (PT) wird der größte Anteil des glomerulär filtrierte Kalziums, in etwa 65 %, parazellulär reabsorbiert (56) (Abbildung 4). Triebkraft dieser passiven Reabsorption von Kalzium ist das lumenpositive transepitheliale Potential, das durch aktive, transzelluläre Natriumreabsorption und passive, parazelluläre Chloridreabsorption im mittleren und späten PT entsteht. Bislang ist für die Kalziumreabsorption im PT keine hormonelle Kontrolle bekannt (31).

In der dünnen ab- (dTL) sowie dünnen aufsteigenden Henle-Schleife (aTL) findet nach aktuellem Kenntnisstand keine Kalziumreabsorption statt (70).

Neben der Reabsorption von Kalzium im PT spielt die Reabsorption in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (TAL) eine besondere Rolle (Abbildung 4 und Abbildung 5). Dort werden v. a. im kortikalen Verlauf der murinen TAL etwa 20 bis 25 % des glomerulär filtrierte Kalziums parazellulär reabsorbiert (56, 85). Die Triebkraft dieses Prozesses in der TAL ist, wie im PT, ein lumenpositives transepitheliales Potential. In der TAL entsteht dieses durch die transzelluläre Reabsorption von Natrium, Kalium sowie Chlorid über den Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter Unterform 2 (NKCC2) sowie die luminalen Rezirkulation von Kalium über den Kaliumkanal ROMK (37, 23).



**Abbildung 5** Zellmodell der TAL **A** Darstellung der transzellulären Transportprozesse, die zur Generierung des lumenpositiven transepithelialen Potentials beitragen, das die Triebkraft für die parazelluläre Reabsorption von Kationen darstellt. **B** Darstellung der Abnahme der luminalen Natriumchloridkonzentration und des parazellulären Rückflusses von Natriumionen im weiteren Verlauf der TAL, welche zur Aufrechterhaltung des lumenpositiven transepithelialen Potentials führt und die parazelluläre Reabsorption von Kationen v. a. in der kortikalen TAL gewährleistet.

Die Wasserundurchlässigkeit der TAL und die begleitende Natriumreabsorption führen im Verlauf der TAL zu einer deutlichen Abnahme der luminalen Natriumchloridkonzentration. Da der parazelluläre Weg kationenselektiv ist, bildet sich über das Epithel ein lumenpositives Natriumdifusionspotential. Dieses Natriumdifusionspotential ist im Verlauf der cTAL maßgeblich für die Aufrechterhaltung des lumenpositiven transepithelialen Potentials (76). Die Reabsorption von Kalzium in der cTAL wird

durch PTH und Kalzitonin sowie verschiedene andere Hormone gefördert (19). Diese Hormone bewirken einen gesteigerten Natriumchloridtransport sowie eine Steigerung des transepithelialen lumenpositiven Potentials durch eine intrazelluläre Anhäufung von cyclischem Adenosinmonophosphat, das die Aktivität der verschiedenen am transzellulären Transport beteiligten Transporter, Kanäle und Pumpen (ATPasen) steigert (19, 29).

Im späten distalen Konvolut (DCT) und im Verbindungstubulus (CNT) findet die Reabsorption von Kalzium transzellulär statt (17, 55). Insgesamt werden in diesem Abschnitt etwa 10 % des glomerulär filtrierten Kalziums reabsorbiert (56). Die transzellulären Transportprozesse des Kalziums in DCT und CNT sind der hauptsächliche Wirkort kalziotropischer Hormone wie PTH, Kalzitriol und Östrogen, die alle die Reabsorption von Kalzium in diesen Nephronabschnitten fördern (55, 80).

Im Urin werden etwa ein bis fünf Prozent des glomerulär filtrierten Kalziums ausgeschieden (52). Die Ausscheidung von anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) verhält sich dabei physiologischerweise stets gegenläufig zur Kalziumausscheidung, was insbesondere zur Vermeidung von Kalzium-Phosphat-Präzipitaten von Bedeutung ist. Das glomerulär filtrierte  $P_i$  wird zu ca. 80 % im PT über verschiedene Natrium-Phosphat-Kotransporter ( $NaPiIIa$ ,  $NaPiIIc$ ,  $PiT2$ ) reabsorbiert, dabei nimmt in der ausgewachsenen Maus der PTH-sensitive Natrium-Phosphat-Kotransporter  $NaPiIIa$  die bedeutsamste Stellung ein. PTH bewirkt eine schnelle intrazellulär Aufnahme des in der luminalen Zellmembran lokalisierten  $NaPiIIa$  durch Endozytose (7), was eine vermehrte  $P_i$  Ausscheidung mit dem Urin nach sich zieht.

### **1.2.2 Magnesiumhomöostase**

Physiologischerweise dient Magnesium verschiedenen Enzymen als Kofaktor, so z. B. auch der im Myosinkopf der Skelettmuskulatur lokalisierten ATPase. Die Blockade von Ionenkanälen insbesondere bei der Neurotransmission ist eine weitere wichtige Aufgabe des Magnesiums. Des Weiteren steuert Magnesium die neuromuskuläre Erregbarkeit und ist für die korrekte Freisetzung von PTH aus den Nebenschilddrüsen essenziell.

Ähnlich dem Kalziumhaushalt befindet sich der größte Anteil, etwa zwei Drittel des im Körper vorhandenen Magnesiums im Knochen, knapp ein Drittel intrazellulär und nur etwa 1 % im Extrazellulärraum (52). Auch für den Magnesiumhaushalt bildet das Zusammenspiel von intestinaler Aufnahme, dem Knochen als Speicher und der Niere zu Ausscheidungszwecken die Grundlage. Neben den am Magnesiumhaushalt maßgeblich beteiligten Organen sind PTH und Kalzitriol sowie der CaSR für die Magnesiumhomöostase unerlässlich (Abbildung 3). Daraus ist die enge Verzahnung des Magnesium- und Kalziumhaushaltes ersichtlich, die sich auch in der Funktion der Niere zeigt.

Hypomagnesiämien treten durch Störungen der intestinalen Aufnahme, durch intestinale Verluste oder durch eine gestörte renale Magnesiumreabsorption auf. Bei intakter Darm- und Nierenfunktion

kommen drei weitere Ursachen in Frage: ein verminderter Magnesiumgehalt der Nahrung, eine Verschiebung des extrazellulären Magnesiums nach intrazellulär oder in die Knochenmatrix sowie Verluste, z. B. durch Pankreatitiden oder Verbrennungen (10). Im Gegensatz dazu treten Hypermagnesiämien bei intakter Nierenfunktion insbesondere durch gesteigerte Magnesiumaufnahme oder gesteigerte Magnesiumfreisetzung aus dem Intrazellulärraum z. B. im Rahmen von Verletzungen oder Schock auf (10). Über die regulatorischen Vorgänge im Rahmen dieser Störungen ist wenig bekannt.

#### *1.2.2.1 Aufgaben der Niere im Rahmen der Magnesiumhomöostase*

Etwa 80 % des Plasmamagnesiums sind nicht proteingebunden und werden glomerulär frei filtriert (52). Die Reabsorption von Magnesium in der Niere findet insbesondere im PT und der TAL sowie im DCT statt (Abbildung 4). Dabei nutzt Magnesium in PT und TAL dieselben Triebkräfte wie Kalzium und wird parazellulär reabsorbiert. Allerdings werden nur etwa 15 bis 25 % des glomerulär filtrierten Magnesiums im PT reabsorbiert und etwa 50 bis 70 % in der TAL, insbesondere in ihrem kortikalen Verlauf (68, 20). Über transzellulären Transport werden im DCT weitere fünf bis 15 % (80, 23) wiederaufgenommen.

Der Urin enthält schließlich etwa fünf bis 20 % des glomerulär filtrierten Magnesiums (52).

## **1.3 Tight Junctions und Claudine**

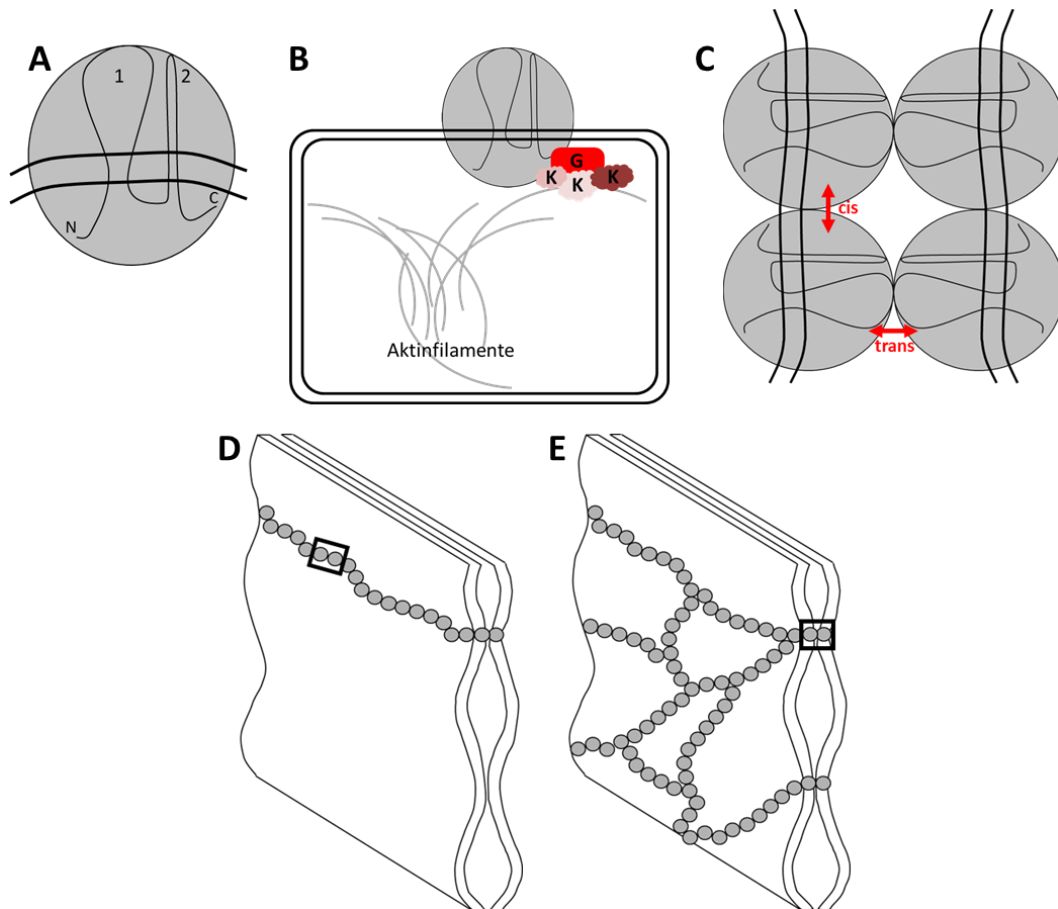
### **1.3.1 Tight Junctions**

Die Schlussleisten (tight junctions = TJ) eines Epithels unterteilen die Zellen in ein apikales und basolaterales Kompartiment und bilden das anatomische Korrelat des parazellulären Transportwegs. Je nach Lokalisation zeigen TJ unterschiedliche Ausprägungen.

In Epithelien mit sehr hoher parazellulärer Transportleistung, wie dem des PT der Säugerniere, zeigt sich in Gefrierbruchstudien meistens nur ein einreihiger TJ Strang, wohingegen in mittel bis dichten Epithelien, wie dem des DCT, vier- bis siebenreihige miteinander in Verbindung stehende Stränge gefunden werden (16). Abbildung 6 D und E zeigen eine schematische Darstellung eines durchlässigen und eines dichten Epithels.

TJ bestehen aus verschiedenen Komponenten wie Membran- und Gerüstproteinen sowie regulatorischen Proteinen, wie z. B. Kinasen (Abbildung 6 B). Um einen TJ Strang zu bilden, kommt es zur Aneinanderlagerung mehrerer Proteine innerhalb einer Plasmamembran und im Interzellulärspalt. Die Claudine gehören, so wie Occludin, Trizellulin und MarvelD3, zur Gruppe der Membranproteine (Abbildung 6 A). Gerüstproteine, wie z. B. die unterschiedlichen Zonula occludens Proteine und das Multi-PDZ Domänen Protein 1, binden sowohl am Carboxyterminus gelegenen PDZ-Bindemotiv dieser TJ Proteine als auch an den Aktinfilamenten der Zelle und schaffen auf diese

Weise eine Verbindung der TJ mit dem Zytoskelett (Abbildung 6 B). Im Gegensatz dazu kann Occludin direkt mit dem Zytoskelett interagieren (34).



**Abbildung 6** Schematische Übersicht über Claudine und deren Interaktionen **A** Claudin. Vier Transmembranomänenprotein mit zytosolisch gelegenen Carboxy- und Aminoterminus (C und N), sowie größerer, erster (1; aus ca. 50 Aminosäuren bestehend) und kleinerer, zweiter (2; aus ca. 25 Aminosäuren bestehend (40)) extrazellulärer Schleife. **B** Verankerung des Claudins über das am C-Terminus gelegene PDZ-Bindemotiv über ein Gerüstprotein (G) mit dem Zytoskelett (Aktinfilamente). Verschiedene Kinasen (K) binden ebenfalls in diesem Bereich der TJ und weisen TJ regulierende Funktionen auf. **C** Interaktion von vier Claudinen. Cis-Interaktion, innerhalb der Zellmembran einer Zelle und trans-Interaktion zwischen den Claudinen zweier benachbarter Zellen. **D** Schema zweier Plasmamembranen eines durchlässigen Epithels mit apikal gelegener einreihiger TJ. Schwarzer Kasten markiert beispielhaft eine wie in C gezeigte cis-Interaktion. **E** Schema zweier Plasmamembranen eines dichten Epithels mit verzweigten, mehrreihigen TJ. Schwarzer Kasten zeigt beispielhaft eine wie in C gezeigte trans-Interaktion.

Während sich in den meisten Untersuchungen zur Occludinfunktion eine Barrierefunktion zeigte, spielen Claudine für die parazelluläre Permeabilität eine entscheidende Rolle (28, 38).

### 1.3.2 Claudine

Die ersten Claudine, Claudin 1 und 2, wurden 1998 aus der Leber des Huhns von der Arbeitsgruppe um Furuse isoliert (32), seitdem wächst die Proteinfamilie der Claudine und besteht in Säugetieren aus mittlerweile 27 Mitgliedern (63). Claudine sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 21 bis 28 kDa (40). Die intrazellulär gelegenen Anteile der Claudine dienen der Regulation der

Claudine selbst. Posttranslationale Modifikationen wie Palmitoylierung und Phosphorylierung steuern z. B. die zelluläre Lokalisation des entsprechenden Claudins (40).

In der TJ gehen Claudine verschiedene Interaktionen mit sich selbst und anderen Membranproteinen ein, dabei werden cis- und trans-Interaktionen unterschieden (Abbildung 6 C, D und E). Sowohl cis- als auch trans-Interaktionen können dabei je nach Claudinisoform mit derselben oder einer anderen Claudinisoform gebildet werden. Dabei werden cis-Interaktionen verschiedener Isoformen als heteromer und derselben Isoform als homomer bezeichnet. Trans-Interaktionen werden analog als hetero- und homotypisch bezeichnet (40).

In Bezug auf die Permeabilität des parazellulären Transportwegs können Claudine sowohl barriere- als auch porenbildende Funktionen übernehmen, dabei sollen nach derzeitigem Kenntnisstand mehrere, sich zusammenlagernde erste extrazelluläre Schleifen eine Pore bilden (38). Für die Merkmale der durch diese Interaktion entstehenden Pore sind die Eigenschaften der ersten extrazellulären Schleife verantwortlich (40).




Sowohl die junctional exprimierten Claudinisoformen, als auch das Verhältnis der exprimierten Claudinisoformen sind dabei für die Permeabilitätseigenschaften des parazellulären Transportwegs entscheidend (51).

### **1.3.3 Claudine in der murinen Niere**

Jedes Nephronsegment weist ein spezifisches Claudinexpressionsmuster auf. In der adulten murinen Niere sind bislang die in Abbildung 7 gezeigten Claudinisoformen gefunden und in Bezug auf ihre Lokalisation genauer untersucht worden.

Abbildung 7 beschränkt sich dabei auf die wahrscheinlichsten Expressionen. Neben den in Abbildung 7 gezeigten Claudinen, kann die Expression von Claudin 21, 24 und 25 in der murinen Niere mittels PCR festgestellt werden, wobei zur Verteilung dieser Claudine im Nephron bislang nichts bekannt ist (63). Claudin 5 und 15 sind in der murinen Niere lediglich im Endothel beschrieben (51).

Bei einigen Claudinen gibt es widersprüchliche Literatur bezüglich ihrer segmentspezifischen, in Abbildung 7 gezeigten Expression. Claudin 3 findet sich in einer anderen Immunfluoreszenzfärbung lediglich im CD der Maus, Claudin 11 in keinem Nephronabschnitt (41). Die in PT und TAL mittels Immunfluoreszenzfärbung gefundene Expression von Claudin 11 wird als eine Interaktion des verwandten Antikörpers mit Claudin 10 gedeutet (51, 38). Claudin 14 kann außerdem mittels Northern Blotting nicht in der Niere gefunden werden, allerdings zeigt sich in einer anderen Untersuchung mittels Immunfluoreszenzfärbung eine Expression in PCT, dTL und TAL (51, 26). Mittels PCR wird Claudin 18 in der Niere einmal nicht, ein anderes Mal mit einer geringfügigen Expression in der TAL nachgewiesen (83, 9).

Bowman Kapsel (parietales Blatt)	Proximaler gewundener Tubulus	Proximaler gerader Tubulus	Dünne absteigende Henle Schleife	Dünne aufsteigende Henle Schleife	Dicke aufsteigende Henle Schleife	Distaler Tubulus	Sammelrohr
							
Claudin 1 <sup>1(IF)</sup>	Claudin 2 <sup>2(IF)</sup> Claudin 2 <sup>2(IF, isH)</sup>						
					Claudin 3 <sup>3(IF)</sup>		
				Claudin 4 <sup>4(IF)</sup>			Claudin 4 <sup>4(IF), 3(IF)</sup>
			Claudin 7 <sup>4(IF)</sup>				Claudin 7 <sup>4(IF)</sup>
			Claudin 8 <sup>4(IF)</sup>	Claudin 8 <sup>4(IF)</sup>			Claudin 8 <sup>4(IF), 1(IF)</sup>
				Claudin 10 <sup>5(IF)</sup>			
	Claudin 10 <sup>1(IF)</sup>				Claudin 10 <sup>1(IF)</sup>		
	Claudin 12 <sup>6(NB, PCR)</sup>						
					Claudin 14 <sup>7(PCR)</sup>		Claudin 14 <sup>8(X)</sup>
					Claudin 16 <sup>1(IF)</sup>		
					Claudin 16 <sup>9(PCR)</sup>		
					Claudin 16 <sup>10(IF)</sup>		
					Claudin 17 <sup>11(IF)</sup>		
					Claudin 18 <sup>12(IF)</sup>		Claudin 18 <sup>12(IF)</sup>
					Claudin 19 <sup>9(PCR)</sup>		
				Claudin 19 <sup>10(IF)</sup>			

**Abbildung 7** Nach Nephronabschnitt gegliederte Claudinexpression in der murinen Niere mit Vermerk des zum Nachweis verwandten Verfahrens. IF = Immunfluoreszenz, isH = in situ Hybridisierung, PCR = polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion, NB = Northern Blotting, X = X-Gal Färbung. <sup>1</sup>(51); <sup>2</sup>(27); <sup>3</sup>(43); <sup>4</sup>(58); <sup>5</sup>(81); <sup>6</sup>(1); <sup>7</sup>(33); <sup>8</sup>(6); <sup>9</sup>(53); <sup>10</sup>(4); <sup>11</sup>(54); <sup>12</sup>(41).

Claudin 6, 9 und 13 können in der adulten Niere mittels Northern Blotting nicht nachgewiesen werden (51), allerdings werden diese Claudine mittels PCR in verschiedenen Abschnitten bzw. in der Gesamtnierenprobe der neonatalen Niere nachgewiesen (1).

### 1.3.3.1 Claudin 16

Verschiedene Mutationen von Claudin 16, auch als Paracellin-1 bezeichnet, führen zum Krankheitsbild der autosomal-rezessiv vererbten familiären Hypomagnesiämie mit Hyperkalzurie und Nephrokalzinose (FHHNC), wobei sich die auftretenden Symptome auch nicht durch orale oder parenterale Magnesiumsubstitution beheben lassen (77).

Die Wichtigkeit dieses Proteins in Bezug auf die Magnesiumhomöostase gab in der Folge Anlass zu zahlreichen, kontrovers diskutierten Zellkulturuntersuchungen in denen versucht wurde die Eigenschaften und Besonderheiten dieses Claudins weiter zu spezifizieren. Während zum einen eine durch Überexpression von Claudin 16 gesteigerte Natriumpermeabilität gefunden wird (39), können andere Untersuchungen eine gesteigerte Permeabilität für Magnesium zeigen (46, 39, 50). Diese



Steigerung der Magnesiumpermeabilität fällt jedoch im Allgemeinen zu gering aus, um die gravierenden Folgen einer Mutation des Claudin 16 zu erklären.

Bis heute gibt es zwei Claudin 16 defiziente Mausmodelle, mit Hilfe derer versucht wird die physiologische Bedeutung des Claudin 16 in der TAL aufzudecken. Die Modelle unterscheiden sich durch die Art der Induktion der Claudin 16 Defizienz (44, 83). Bei der Claudin 16 knockdown (16 KD) Maus wird eine spezifische small interfering RNA (siRNA) benutzt, die zur nahezu vollständigen Unterdrückung der Claudin 16 Translation führt. Beim zweiten Mausmodell handelt es sich um eine klassische knockout (16 KO) Maus. In der Claudin 16 KD Maus wird Claudin 16 als nicht-selektive Kationenpore beschrieben, so dass es in der TAL dieser Tiere zur Minderung der Natriumpermeabilität in Relation zur Chloridpermeabilität kommt. Die Autoren erklären die Auswirkungen einer Claudin 16 Mutation und den daraus resultierenden Phänotyp der FHHNC durch eine Minderung der parazellulären Triebkraft für Kationen in der TAL (44). Die 16 KO Maus zeigt keine Veränderung der Natriumpermeabilität in Relation zur Chloridpermeabilität, allerdings eine direkte Minderung der Permeabilität von Kalzium und Magnesium in Relation zur Natriumpermeabilität (83).

Hou et al. zeigen durch die Untersuchung von Claudin 19 außerdem, dass Claudin 16 und 19 in der Zellkultur heteromere Interaktionen eingehen und dass Claudin 16 Claudin 19 benötigt, um in die TJ der murinen TAL eingebaut zu werden (42, 41).

#### 1.3.3.2 *Claudin 19*

Auch zur Funktion von Claudin 19 zeigen verschiedene Zellkulturexperimente kontroverse Daten. Die Gruppe um Angelow zeigt für Claudin 19 eine Funktion als selektive Kationenbarriere gegen mono- und divalente Kationen bei unveränderter Anionenpermeabilität, während dieser Befund durch Hou et al. in derselben Zelllinie nicht bestätigt wird (4, 42). Die Funktion als Kationenbarriere kann allerdings funktionell gut mit dem Vorkommen in peripheren Nervenscheiden in Einklang gebracht werden (4).

In der TAL werden Claudin 16 und 19 jedoch gemeinsam exprimiert. Für die Koexpression von Claudin 16 und 19 stellt Hou et al. in der Zellkultur eine starke Zunahme der Natrium- sowie eine Verminderung der Chloridpermeabilität fest (42).

Durch ein Claudin 19 defizientes Mausmodell (ebenfalls Knockdown durch siRNA, Claudin 19 KD), konnten weitere Erkenntnisse zur Interaktion und Funktion von Claudin 19 in der TAL gewonnen werden. Claudin 19 KD Mäuse zeigen den, durch die Claudin 16 Defizienz, bekannten Phänotyp der FHHNC, der in dieser Weise bereits durch die Claudin 19 Mutation beim Menschen bekannt ist. Dieser entstehende Phänotyp erklärt sich gut dadurch, dass Claudin 19 KD Mäuse bei unveränderter Claudin 16 mRNA Expression kaum junctional lokalisiertes Claudin 16 in der TAL aufweisen (41).

Die Funktion des Claudin 19 in der TAL ist daher im direkten Zusammenhang mit der Funktion des Claudin 16 zu sehen. Das Fehlen dieser funktionellen Einheit, bestehend aus Claudin 16 und 19, geht mit dem renalen Phänotyp der FHHNC einher. Allerdings sind die genauen pathophysiologischen Vorgänge, die bei fehlendem oder mutiertem Claudin 16 oder 19 zum Phänotyp der FHHNC führen, bis heute nicht abschließend geklärt (siehe Kapitel 1.3.3.1).

Zur Funktion des Claudin 19 in anderen Nephronabschnitten, mit sich von der TAL unterscheidenden Claudinzusammensetzungen, insbesondere ohne Claudin 16 Expression, sind derzeit noch keine Daten vorhanden.

#### 1.3.3.3 *Claudin 14*

Grundsätzlich wird Claudin 14 in der Niere nur niedrig exprimiert. Dies erklärt den fehlenden renalen Phänotyp der Claudin 14 Defizienz unter physiologischen Bedingungen (6, 22) und die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich des Expressionsmusters. Durch die Aktivierung des CaSR, z. B. durch gesteigerte Plasmakalziumkonzentrationen, kann die Claudin 14 Expression in der TAL jedoch gesteigert werden (33, 22).

Zellkulturexperimente zeigen, dass Claudin 14 cis-Interaktionen mit sich selbst und Claudin 16 eingehen kann. Die Interaktion von Claudin 14 mit der aus Claudin 16 und Claudin 19 bestehenden funktionellen Einheit führt dabei *in vitro* zu einer starken Minderung der Kationenselektivität der TJ (33). In Zellkulturen mit hoher parazellulärer Permeabilität, die weder Claudin 16 noch Claudin 19 exprimieren, zeigt sich durch die Überexpression von Claudin 14 eine Steigerung des transepithelialen Widerstands und eine Minderung der Permeabilität für Natrium und divalente Kationen (6, 22).

Passend dazu entwickeln Claudin 14 defiziente Mäuse unter erhöhter diätetischer Kalziumzufuhr eine Hypermagnesiämie sowie eine verminderte Ausscheidung von Kalzium und Magnesium im Urin (33), d. h. im Tiermodell bestätigten sich die Ergebnisse der Zellkulturexperimente. Die TJ der TAL kann sich demnach unter erhöhter Kalziumlast ohne Claudin 14 nicht ausreichend gegen Kationen abdichten um eine gesteigerte renale Kalziumausscheidung zu gewährleisten.

#### 1.3.3.4 *Claudin 10*

Claudin 10 kommt in mindestens sechs verschiedenen Isoformen vor (36). Claudin 10a und 10b weichen voneinander in Länge und Aminosäuresequenz ihrer ersten extrazellulären Schleifen voneinander ab (81). Zusätzlich existiert eine Variante von Claudin 10a, die im Vergleich zu Claudin 10a eine um 19 Aminosäuren verkürzte erste Schleife aufweist (36). In Zellkultur-experimenten finden sich diese drei Varianten in der TJ (36). Die drei weiteren Isoformen des

Claudin 10 befinden sich in Zellkulturexperimenten lediglich intrazellulär und wurden bisher nicht weiter untersucht.

Claudin 10a und 10b werden auf mRNA Ebene in der Niere in ähnlichem Maße exprimiert (81). Käufliche Claudin 10 Antikörper unterscheiden nicht zwischen den Isoformen, so dass eine Bestimmung der Lokalisation der Isoformen über immunhistologische Verfahren nicht möglich ist. Mittels in situ Hybridisierung kann eine, von kortikal nach medullär abnehmende Claudin 10a Expression sowie eine von kortikal nach medullär zunehmende Claudin 10b Expression festgestellt werden (81). Allerdings schließt diese Untersuchung die Variante des Claudin 10a nicht ein. Eine Expressionsanalyse der Claudin 10 Varianten in isolierten Nephronsegmenten von Günzel et al. zeigt mit Hilfe einer RT-PCR eine Expression von Claudin 10a und dessen Variante im PT, Claudin 10a und 10b in der medullären TAL, sowie Claudin 10b im medullären CD (36). Die Expression der Variante des Claudin 10a beschränkt sich dabei auf Nephronsegmente in denen auch Claudin 10a exprimiert ist (36). Breiderhoff et al. zeigen, ebenfalls mit Hilfe einer RT-PCR, eine exklusive Expression von Claudin 10a im PT und Claudin 10b in der TAL (9).

In verschiedenen Zellkulturexperimenten führt die Expression von Claudin 10a zu einer gesteigerten Anionenpermeabilität, insbesondere für Nitrat und Chlorid (81, 36). Die Expression von Claudin 10b in Zellkulturen erbringt eine gesteigerte Permeabilität für monovalente Kationen sowie in geringerem Maße für divalente Kationen (81, 36).

Die Gruppe um Breiderhoff et al. etablierte und untersuchte ein Claudin 10 defizientes Mausmodell (Claudin 10 KO nur im distalen Nephron). Bei erhaltener Claudin 10a Expression im PT besteht ein Claudin 10b Verlust in der TAL. TAL der Claudin 10 KO Mäuse zeigen eine deutlich reduzierte Natriumpermeabilität bei gesteigerter Permeabilität divalenter Kationen (9). Diese Ergebnisse implizieren, dass Claudin 10b in der TAL am ehesten monovalenten Kationen als Pore dient.

## 1.4 Fragestellung

Der parazelluläre Transportweg ist von besonderer Bedeutung für die energetisch günstige Reabsorption glomerulär filtrierter Stoffe in der Niere. Für die Funktion dieses Transportwegs spielen sowohl die Länge des parazellulären Spalts, als auch seine Permeabilitätseigenschaften eine entscheidene Rolle. Dabei sind die Claudine die wichtigsten permeabilitätsbestimmenden Komponenten der Tight Junctions. Auf diesem Hintergrund entstanden die Fragen, die in den vorliegenden Experimenten bearbeitet wurden.

- Wie unterscheiden sich die Tight Junction Muster entlang des Nephrons?  
In welchen Nephronabschnitten entlang der kortikomedullären Achse werden die untersuchten Claudine exprimiert?  
Finden sich unter den betrachteten Claudinen Kollokalisierungen, die möglicherweise für spätere funktionelle Betrachtungen relevant sein könnten?
- Wird die Claudinexpression in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife durch verschiedene diätetische Kalzium- bzw. Magnesiumbelastungen beeinflusst? Auf welcher Ebene der Proteinbiosynthese können diese Veränderungen beobachtet werden? Ändern sich Transkription, zelluläre Gesamtmenge oder zelluläre Lokalisation des jeweiligen Claudins? Zeigen sich in anderen Nephronabschnitten unter den verschiedenen Salzbelastungen Veränderungen der subzellulären Lokalisation der untersuchten Claudine?

## 2. Methoden

### 2.1 Materialien

Sämtliche im Kapitel 2 erwähnten Chemikalien stammen, wenn nicht anders bezeichnet, von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland), von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) sowie von Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland) und entsprechen dem höchsten Reinheitsgrad.

### 2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche C57Bl6/J Mäuse, die zwischen 38 und 71 Tage alt waren.

#### 2.2.1 Diäten

Die Mäuse erhielten über einen Zeitraum von acht Tagen unterschiedliche Diäten, wobei der achte Tag der Diät der Tag der Probengenerierung war.

Die Diäten unterschieden sich hinsichtlich ihres Kalzium- bzw. Magnesiumgehalts.

**Tabelle 1** Kalzium- und Magnesiumgehalt der verfütterten Diäten.

	<b>Kontrolldiät</b>	<b>Niedrig- kalzium- diät</b>	<b>Hoch- kalzium- diät</b>	<b>Niedrig- magnesium- diät</b>	<b>Hoch- magnesium- diät</b>
<b>Kalziumgehalt</b> [%]	0,90	<b>&lt;0,04</b>	<b>4,6</b>	0,90	0,90
<b>Magnesiumgehalt</b> [%]	0,21	0,21	0,21	<b>&lt;0,02</b>	<b>1,1</b>
<b>Chloridgehalt</b> [%]	0,35	0,35	0,35	0,35	<b>1,1</b>

Die Kontrolldiät (E15000-04, ssniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland; genaue Zusammensetzung siehe Abbildung 40 im Anhang) enthielt 0,90 % Kalzium und 0,21 % Magnesium. Die Niedrigkalziumdiät enthielt weniger als 0,04 % Kalzium, die Hochkalziumdiät 4,6 %. Der Magnesiumgehalt der Kalziumdiäten entsprach dem der Kontrolldiät. Die Niedrigmagnesiumdiät enthielt weniger als 0,02 % Magnesium, die Hochmagnesiumdiät 1,1 %. Der Kalziumgehalt der Magnesiumdiäten entsprach dem der Kontrolldiät (Tabelle 1). Außerdem enthielt die

Hochmagnesiumdiät mehr Chlorid als die Kontrolldiät. Die übrige Zusammensetzung des Futters war nicht unterschiedlich. Die Diäten wurden von der ssniff Spezialdiäten GmbH (Deutschland) hergestellt und der jeweils veränderte Kalzium- bzw. Magnesiumgehalt durch die SGS Germany GmbH (Laboratory Services, Deutschland) überprüft.

Die Tiere hatten während der gesamten Zeit freien Zugang zu ihrem jeweiligen Diätfutter in Pelletform und zu Trinkwasser, das sich zwischen den Gruppen nicht unterschied.

## 2.3 Erhebung der metabolischen Daten

Zur Erhebung der metabolischen Daten dienten aus der Harnblase der Maus durch Punktion mittels Kanüle (27G) gewonnener Urin sowie aus der Vena cava inferior gewonnenes Blut (ca. 1 ml je Maus). Das Blut diente der Bestimmung des Hämatokrits und der Gewinnung von Plasma zur Erhebung der weiteren klinisch chemischen Parameter (Zentrallabor des UKSH, Campus Kiel). Der Urin wurde ebenfalls im Zentrallabor des UKSH, Campus Kiel analysiert.

Die zur Punktion der Vena cava genutzte Kanüle (22G) wurde vor der Benutzung heparinisiert (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland). Zur Ermittlung des Hämatokrits wurde eine Kapillare (Mikro-Hämatokrit-Kapillare, Brandt GmbH und Co. KG, Wertheim, Deutschland) verwandt und bei 13500 x g für zwei Minuten zentrifugiert (EBA 21, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Das restliche Blut wurde mit 10000 x g für zwei Minuten zentrifugiert (Biofuge vito, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland). Urin und Plasma wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C verwahrt.

Außerdem wurde jede Maus vor der Probengewinnung gewogen und danach gemessen. Dabei wurde der Messwert von der Nasenspitze bis zur Schwanzwurzel als Körperlänge festgelegt.

### 2.3.1 Berechnung der normalisierten Urinparameter

Die Darstellung der erhobenen Urinparameter aus dem Spontanurin erfolgte normalisiert auf die Kreatininkonzentration im Urin.

### 2.3.2 Berechnung der Konzentration der Osmolyte im Urin

Die Berechnung der Konzentration der Osmolyte im Urin der Mäuse erfolgte nach folgender Formel:

$$Urin_{Osmolyte} = U_{Na^+} + U_{K^+} + U_{Cl^-} + U_{Ca^{2+}} + U_{Mg^{2+}} + U_{Phosphat} + U_{Harnstoff} + U_{Krea}$$

$Urin_{Osmolyte}$ : Konzentration der Osmolyte im Urin in mM;  $U_X$ : Konzentration des Stoffes X im Urin in mM, der Index definiert das entsprechende Ion bzw. den Stoff; Krea = Kreatinin.

### 2.3.3 Berechnung der fraktionellen Exkretionen

Die Berechnung der fraktionellen Exkretionen erfolgte nach folgender Formel:

$$FE_x = \frac{U_x \times P_{Krea}}{P_x \times U_{Krea}} \times 100$$

$FE_x$ : fraktionelle Exkretion der Substanz X in %;  $U_x$ : Urinkonzentration der Substanz X in mM;  
 $P_{Krea}$ : Kreatininkonzentration im Plasma in mM;  $P_x$ : Plasmakonzentration der Substanz X in mM;  
 $U_{Krea}$ : Kreatininkonzentration im Urin in mM.

## 2.4 Enzymatische Tubuluspräparation

Die Mäuse wurden zur enzymatischen Tubuluspräparation in einer Narkosebox mit 5 % (v/v) Isofluran anästhesiert (Abbott, Wiesbaden, Deutschland, appliziert über Dräger Vapor 19.3 in ZUA-82-GME Gasmischeinheit, FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland). Anschließend atmete die Maus weiterhin Isofluran (3 % (v/v)) über eine Maske. Zur Entnahme der Nieren wurde das Abdomen eröffnet. Vena cava inferior und Aorta abdominalis

**Tabelle 2** Zusammensetzung der (kollagenasehaltigen) Inkubationslösung.

<b>Inkubationslösung</b>	
NaCl	140 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,6 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
Na-Acetat	10 mM
α-Ketoglutarat	1 mM
Ca-Gluconat	1,3 mM
NaOH oder HCl	zur pH-Wert Einstellung auf 7,4
Glycin	375 mg/l
Trypsininhibitor	48 mg/l
DNase I	25 mg/l
<b>Kollagenasehaltige Inkubationslösung</b>	
Kollagenase Typ II	
(PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland))	1 mg/ml Inkubationslösung

wurden dargestellt. Die Vena cava inferior wurde zur Blutentnahme punktiert und so der venöse Schenkel eröffnet. Die Aorta abdominalis wurde etwas kranial der Aufzweigung in die Iliakalgefäße mit einem Gefäßclip versehen und das Gefäß wurde, unter Kompression der kranialen Aorta abdominalis mit einem Wattestäbchen, etwa bis zur Hälfte mit einer Federschere quer eingeschnitten. Über diesen Zugang wurde ein passender Polyethylen-Katheter eingeführt (selbst hergestellt aus RCT-PX-D-1000, Innendurchmesser 1 mm, RCT Reichelt Chemietechnik GmbH und Co., Heidelberg, Deutschland), über den ca. 0,5 ml kollagenasehaltige Inkubationslösung (siehe Tabelle 2) appliziert wurden. Auf diese Weise wurden beide Nieren mit der Enzymlösung perfundiert. Danach erfolgten die sofortige Entfernung des Katheters und die beidseitige Nephrektomie. Die entnommenen Nieren wurden umgehend in Inkubationslösung überführt und die Maus durch Eröffnung des Thorax getötet.

Die Nieren wurden dekapsuliert, die Pole verworfen und das zentrale Stück in möglichst dünne Scheiben geschnitten. Dabei wurde auf eine Schnittrichtung geachtet, die parallel zum Verlauf der TL und CD in der Medulla ausgerichtet war. Die Nierenscheiben wurden in ca. 1,5 ml kollagenasehaltiger Inkubationslösung in einem 2 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt Aktiengesellschaft und Co., Nümbrecht, Deutschland) bei 37 °C und 850 Umdrehungen/min für zehn Minuten im Thermomixer geschüttelt (Compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde abgenommen und in einem weiteren 2 ml Reaktionsgefäß auf Eis verwahrt. Zum Inhalt des ersten Reaktionsgefäßes wurde 1 ml Inkubationslösung gegeben. Dieses Reaktionsgefäß wurde erneut bei 37 °C und 850 Umdrehungen/min für fünf Minuten im Thermomixer geschüttelt. Der Überstand wurde ebenfalls in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis verwahrt. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis fünf Überstände vorhanden waren. Die Tubulussuspension wurde mehrfach durch Sedimentieren, Überstand entfernen und Zugabe von neuer eiskalter Sortierlösung (Tabelle 3) gewaschen.

**Tabelle 3** Zusammensetzung der Sortierlösung

<b>Sortierlösung</b>	
Albumin	500 mg in 1 l Inkubationslösung

Unter einem Stereomikroskop (MZ16, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurden etwa 80 TAL isoliert und anschließend in einem kleinen Volumen Sortierlösung in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Tubulusisolation erfolgte bei 4 °C bis maximal zwei Stunden nach der Nierenentnahme. Die Proben wurden je nach weiterer Bestimmung mit RLT-Puffer (aus dem RNeasy Micro Kit) und  $\beta$ -Mercaptoethanol für die real time RT-PCR (siehe Kapitel 2.5) oder mit Lämmli Puffer



für den Western Blot (WB) (siehe Kapitel 2.6) versehen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis auf Weiteres bei -80 °C gelagert.

## **2.5 Real time RT-PCR**

### **2.5.1 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese**

Für die RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wurden die gesammelten TAL weiterverarbeitet. Hierzu wurde das RNeasy Micro Kit (Qiagen GmbH, Düsseldorf, Deutschland) inklusive DNase-Verdau-Schritt nach Angaben des Herstellers verwandt. Die frisch aufgetauten TAL wurden durch Zugabe eines denaturierenden Lyse-Puffers lysiert, mit Ethanol versetzt und anschließend auf die Silicamembran gegeben. Nach mehreren Waschschritten und dem DNase-Verdau wurde die RNA in einem geringen Volumen RNase freiem Wasser eluiert und auf Eis gelagert.

Die Umschreibung der gewonnen RNA in cDNA wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen GmbH, Düsseldorf, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit Hilfe eines sogenannten Wipeout Puffers wurde in der Probe vorhandene genomische DNA enzymatisch abgebaut. Anschließend wurde in zwei parallelen Ansätzen mit und ohne reverse Transkriptase die eigentliche Umschreibung in cDNA vorgenommen, das Enzym anschließend inaktiviert und die cDNA Proben bis zur weiteren Benutzung bei -80 °C gelagert.

### **2.5.2 Durchführung und Auswertung der real time RT-PCR**

Die Durchführung der real time RT-PCR erfolgte mit SYBR Green I. SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert und vorrangig nach Einlagerung in doppelsträngige DNA fluoresziert.

Im Gegensatz zur herkömmlichen Endpunkt-PCR ist bei der real time PCR unter Verwendung von SYBR Green I, vor der Wiederholung eines gesamten PCR-Zyklus ein weiterer Schritt zur Detektion des Fluoreszenzsignals von SYBR Green I eingefügt. Auf diese Weise kann die Vervielfältigung des Produktes über die Dauer der PCR hinweg beobachtet werden. Außerdem ist ein Rückschluss auf die Ausgangsmenge des Produktes durch die Analyse des Vervielfältigungsplots (siehe Abbildung 9 und zugehöriger Textabschnitt) möglich. Zur Überprüfung der Bildung eines spezifischen Produktes wurden Schmelzkurven und Produktanalysen auf Agarosegelen angefertigt.

#### *2.5.2.1 Auswahl der Primerpaare*

Die Auswahl der Primerpaare erfolgte mittels Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Dabei wurde auf ein Exon-Exon-Grenzen überspannendes Primerdesign bzw. auf das Vorliegen eines Introns im zu amplifizierenden DNA Abschnitt geachtet. Durch dieses Primerdesign sollte eine Vervielfältigung genomischer DNA, die

trotz zweimalig vorangegangener DNase Behandlungen in der cDNA-Probe vorhanden sein könnte, ausgeschlossen werden. Die Sequenzen, Produktlängen sowie die Annealingtemperatur der verwandten Primer finden sich in Tabelle 4.

**Tabelle 4** Primerpaare mit Angabe der Sequenzen, Annealingtemperatur, entstehenden Fragmentgröße in Basenpaaren sowie Schmelztemperatur des entstehenden Produkts. \* Beim Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix abweichende Schmelztemperatur.

<b>Primer</b>	<b>Primersequenz (5' → 3')</b>	<b>Annealing- temperatur in °C</b>	<b>Fragment- größe in bp</b>	<b>Schmelz- temperatur in °C</b>
Claudin 10a – vorwärts	CCGGCCACATTTCACTATCT	59		
Claudin 10a – rückwärts	GCAAAAATGGAACCGAAAAA	59	102	80 bzw. 78*
Claudin 10b – vorwärts	GGAGTCCCCTCCATGCT	52		
Claudin 10b – rückwärts	GCAAAAATGGAACCGAAAAA	48	99	82
Claudin 14 – vorwärts	ACCCTGCTCTGCTTATCC	50		
Claudin 14 – rückwärts	GCACGGTTGCCTTGTA	50	131	88
Claudin 16 – vorwärts	CCATATATGCAGAACATCCCTTG	60		
Claudin 16 – rückwärts	GGTAGGAACCTCACACAGTCCA	59	124	81,5
Claudin 19 – vorwärts	CCCAGCACTCCTGTCAATG	60		
Claudin 19 – rückwärts	GGCATGTGCAGCAGAGAA	59	109	87
β-Aktin – vorwärts	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	59		
β-Aktin – rückwärts	ACCAGAGGCATACAGGGACA	60	104	80,5

Keiner der oben aufgeführten Primer ergab bei der Analyse mit Primer Blast im Mäusegenom Produkte mit ähnlicher Anzahl von Basenpaaren.

Die angegebenen Primer wurden bei Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland) bestellt und mit nukleasefreiem, dampfsterilisiertem Wasser nach Herstellerangaben angesetzt, so dass eine Stocklösung mit einer Konzentration von 100 µM entstand. Diese wurde bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2.5.2.2 Real time RT-PCR der TAL der Kalziumdiättiere

Zur Durchführung der real time RT-PCR diente der QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen GmbH, Düsseldorf, Deutschland) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben.

Die PCR wurde in 96 Well Platten (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) angesetzt, dabei erfolgte die Vervielfältigung der jeweiligen Claudin cDNA aus jeder TAL Probe als dreifach Ansatz (Triplette). Das Endvolumen

jedes einzelnen Reaktionsansatzes betrug 25 µl mit einer jeweiligen Endkonzentration der Primer von 400 nM. Als interne Referenz zur Normalisierung der eingesetzten cDNA Menge in jeder TAL Probe, diente die Amplifikation von β-Aktin, ebenfalls als Triplette (60). In jeder 96 Well Platte wurden je Primerpaar zwei Negativkontrollen durch Zugabe von 1 µl Wasser anstelle der cDNA durchgeführt. Für das Claudin 14 Primerpaar, dessen Primerdesign als einziges nicht die Amplifikation genomischer DNA ausschloss, wurden spezielle Negativkontrollen ausgeführt. Hierzu wurden der PCR je TAL Probe zwei Ansätze ohne stattgefunden reverse Transkription zugeführt (Kapitel 2.5.1). Außerdem wurde jeweils eine Positivkontrolle je 96 Well Platte und Primerpaar durchgeführt. Hierzu diente cDNA aus Niere und Leber.

Die PCR wurde auf einem Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

95 °C für 5 min	
95 °C für 10 s	} 50 Wiederholungen
57 °C für 30 s	
60 °C für 30 s	

Im Anschluss an jede PCR wurde eine Schmelzkurve angefertigt, dabei wurde der vom Gerät vorgegebene Ablauf angewandt. Auf eine 15 s dauernde Denaturierung bei 95 °C folgte eine langsame Temperaturerhöhung von 60 °C auf 95 °C, dabei wurde kontinuierlich das Fluoreszenzsignal aufgenommen.

### 2.5.2.3 Datenanalyse

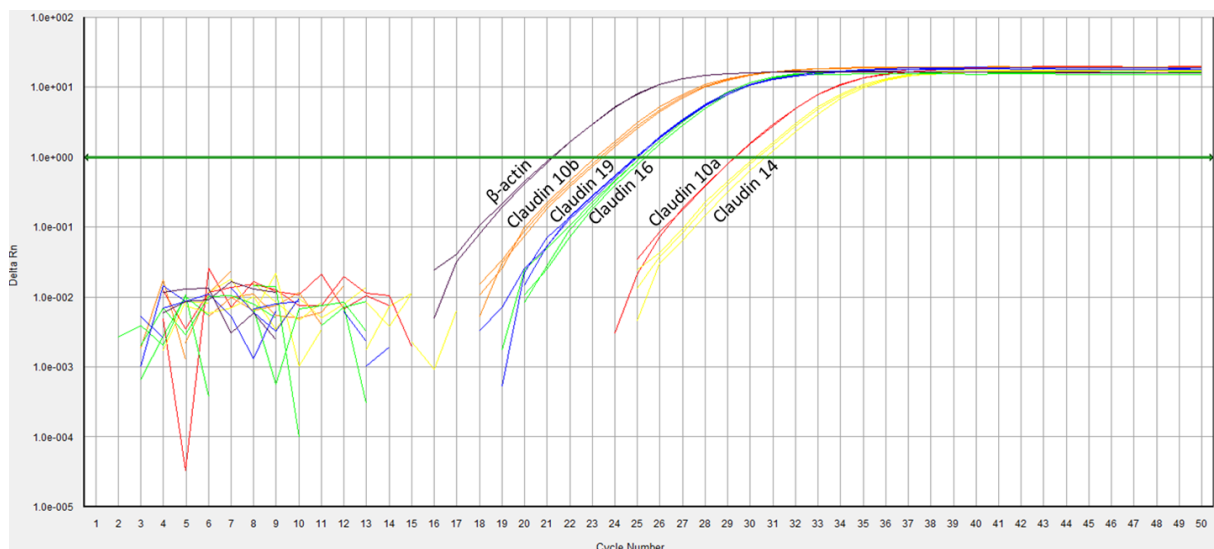
Zur Analyse der Daten wurde die Sequence Detection Software, Version 1.3 (7000 System SDS Software, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwandt.

Jeder Reaktionsansatz wurde hinsichtlich seiner absoluten Fluoreszenzen von SYBR Green I und dem passiven Referenzfarbstoff ROX betrachtet. Ein typischer Verlauf der absoluten Fluoreszenzen im Verlauf der PCR und der nachfolgenden Schmelzkurve ist in Abbildung 8 zu sehen. Zu Beginn der PCR Reaktion liegt die Intensität der Fluoreszenz des SYBR Green I für gewöhnlich unterhalb der Intensität der Fluoreszenz von ROX. Reaktionsansätze mit untypischem Verlauf wurden als Datenpunkte ausgeschlossen.



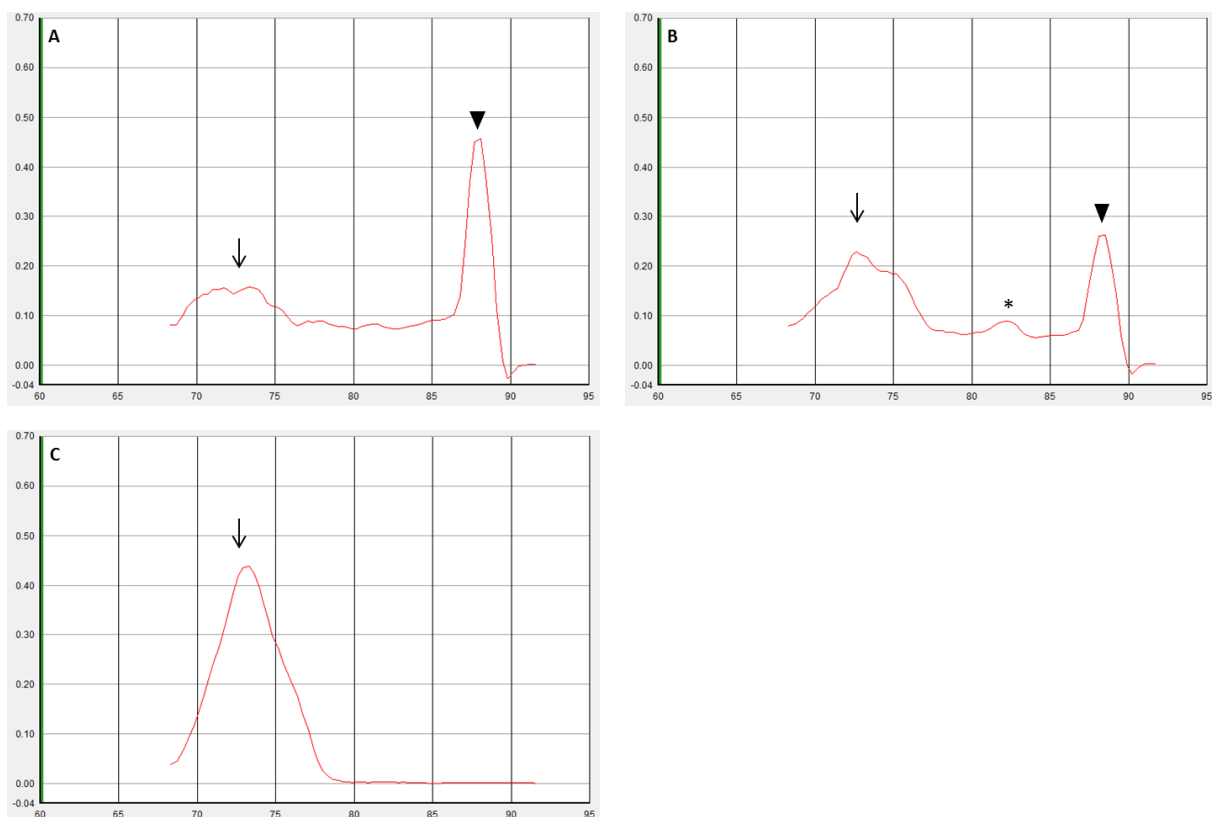
**Abbildung 8** Typischer Verlauf der absoluten Fluoreszenzen (Ordinate) aufgetragen gegen die Zyklusnummer (Abszisse), die rote Linie entspricht der Fluoreszenz von ROX (passiver Referenzfarbstoff), die blaue Linie der Fluoreszenz von SYBR Green I. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der sukzessiven Temperaturerhöhung zur Aufzeichnung der Schmelzkurve.

Danach wurde der Vervielfältigungsplot betrachtet, der als Abbildung des Hintergrund- ( $\Delta$ ) und ROX-korrigierten ( $R_n$ ) SYBR Green I Fluoreszenzsignals ( $\Delta R_n$ ) gegen die Zykluszahl aufgetragen wurde. Die Festlegung der Grundlinie und damit die Hintergrundkorrektur erfolgte dabei automatisch durch das Programm. Diese Ansicht erlaubt die Beurteilung der Vervielfältigung des Produktes sowie in der halblogarithmischen Darstellung die manuelle Festlegung des Schwellenwertes. Dieser soll im ersten bis zweiten Drittel der exponentiellen Phase der Vervielfältigung liegen.



**Abbildung 9** Vervielfältigungsplot. Aufgetragen ist das Hintergrund- und ROX-korrigierte SYBR Green I Fluoreszenzsignal ( $\Delta R_n$ ) einer TAL Probe einer Maus der Kontrolldiätgruppe gegen die Zyklusnummer (Cycle Number) für sämtliche untersuchten Claudine und  $\beta$ -Aktin. Durch die Reaktionsansätze als Triplette entstehen mehrere Kurven je Zielgen. Die horizontale grüne Linie entspricht dem Schwellenwert (hier 1).

Für die Expressionsanalyse mit dem Qiagen Master Mix wurde der Schwellenwert auf 1 festgelegt. Ein exemplarischer Vervielfältigungsplot mit eingezeichnetem Schwellenwert ist in Abbildung 9 dargestellt. Erreicht das Hintergrund- und ROX-korrigierte SYBR Green I Fluoreszenzsignal ( $\Delta R_n$ ) den Schwellenwert, kann an der Abszisse der zugehörige Schwellenwertzyklus ( $C_t = \text{Cycle threshold}$ ) abgelesen werden. Dieser wird im Folgenden als  $C_t$ -Wert bezeichnet. Der  $C_t$ -Wert wird vom Programm als Dezimalzahl angegeben und korreliert negativ mit der cDNA Ausgangsmenge. Die zusammengehörigen Reaktionsansätze eines Triplets mussten in der exponentiellen Phase des Plots einen parallelen Kurvenverlauf aufweisen und gegen Ende der Reaktion dasselbe Plateau erreichen, davon abweichende Ansätze wurden aus der Analyse ausgeschlossen.



**Abbildung 10** Exemplarische Schmelzkurven von verschiedenen Reaktionsansätzen zum Nachweis von Claudin 14. Abszisse: Temperatur in Grad Celsius, Ordinate: negative erste Ableitung des Hintergrund- und ROX-korrigierten SYBR Green I Fluoreszenzsignals ( $\Delta R_n$ ). **A** spezifisches Produkt mit einer Schmelztemperatur von ca. 88 °C (Pfeilspitze) und minimaler Bildung von Primerdimeren (Pfeil) **B** Bildung von Primerdimeren (Schmelztemperatur ca. 73 °C; Pfeil), unspezifischem Produkt (Schmelztemperatur ca. 82 °C; \*) und spezifischem Produkt (Schmelztemperatur ca. 88 °C; Pfeilspitze) **C** ausschließliche Bildung von Primerdimeren (Schmelztemperatur ca. 73 °C; Pfeilspitze).

Die Analyse der Schmelzkurven diente dem Ausschluss von Nebenprodukten sowie dem Ausschluss einer Primerdimerbildung. Als Primerdimere werden unspezifische Nebenprodukte bezeichnet, die durch die Vervielfältigung von Primern untereinander entstehen. Der Ausschluss der Entstehung von Nebenprodukten war notwendig, da der Farbstoff SYBR Green I unspezifisch jede doppelsträngige DNA bindet. Jede doppelsträngige DNA besitzt einen spezifischen Schmelzpunkt, an dem sie in zwei

Einzelstränge aufgeteilt wird. Die Temperatur des Schmelzpunkts steigt dabei mit zunehmendem GC-Gehalt und Länge der DNA (69).

Zur Analyse der Schmelzkurven wurde die negative erste Ableitung des Hintergrund- und ROX-korrigierten SYBR Green I Fluoreszenzsignals ( $\Delta R_n$ ) aufgetragen gegen die Temperatur in Grad Celsius betrachtet (Abbildung 10). Dabei wurde auf die Bildung eines Produktes mit der entsprechenden Schmelztemperatur (Tabelle 4) geachtet. Schmelzkurven mit einer Primerdimerbildung, die wie in Abbildung 10 A oder geringer ausgeprägt war, wurden als Datenpunkte akzeptiert.

Datenpunkte mit Primerdimerbildung oder mit Bildung unspezifischer Nebenprodukte, wie in Abbildung 10 B und C dargestellt, wurden von der Ermittlung des Ct-Werts ausgeschlossen.

Außerdem wurde in den Negativkontrollen auf eine fehlende Bildung eines spezifischen Produkts geachtet, wobei es ausreichend war, wenn eine der beiden Negativkontrollen ohne spezifisches Produkt vorlag. Entstand in beiden Negativkontrollen ein spezifisches Produkt wurden die zugehörigen Datenpunkte nur akzeptiert, wenn die Differenz der Ct-Werte der zugehörigen Negativkontrollen und Proben mehr als fünf Zyklen betrug.

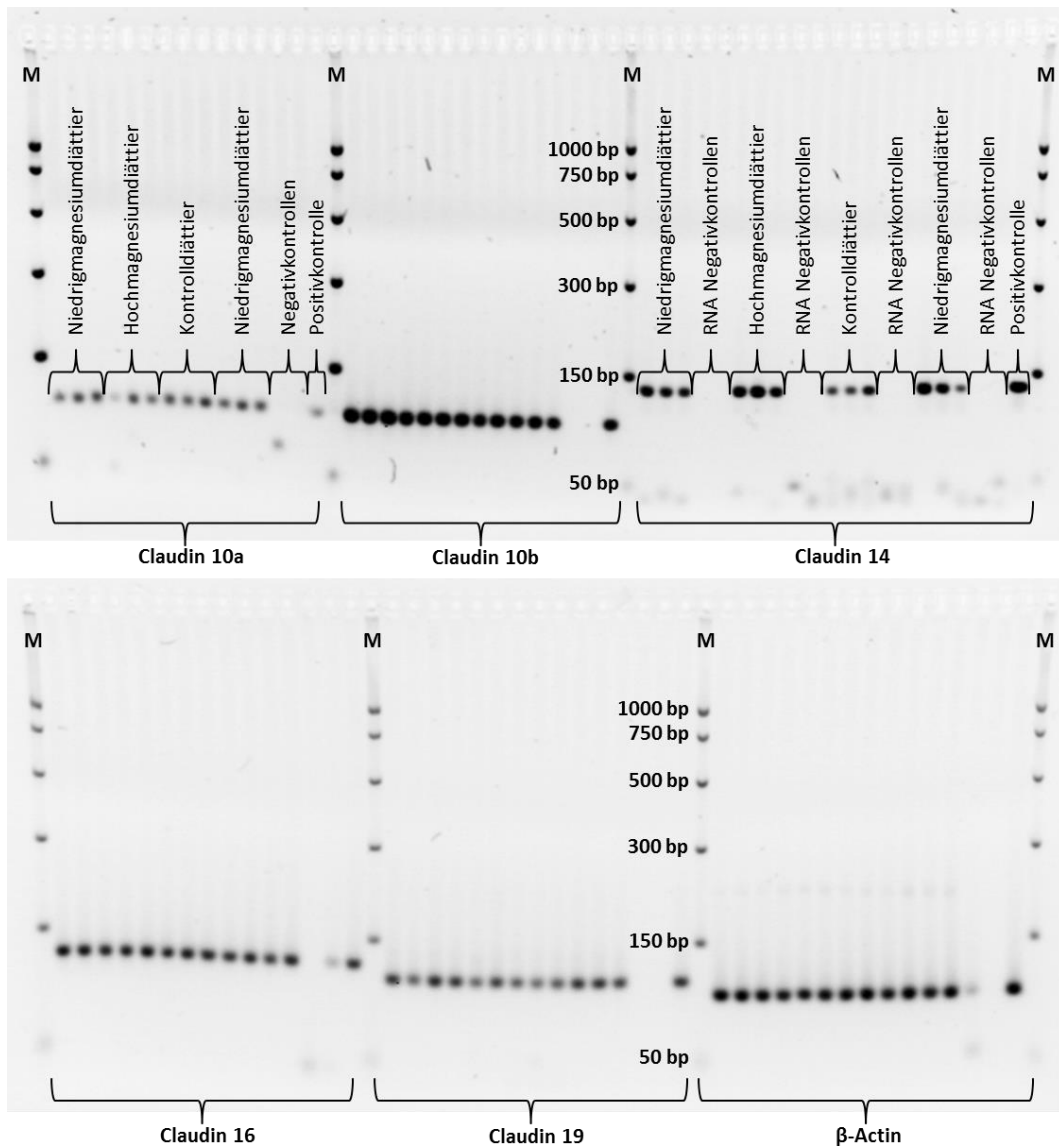
#### 2.5.2.4 Weitere Qualitätskontrolle der PCR Ergebnisse

Zur Absicherung der mit den Schmelzkurven erhobenen und ausgeschlossenen Daten wurden zu jeder 96 Well Platte Agarosegele angefertigt. Hierzu wurde aus 100 ml TBE-Puffer (Rotiphorese 10x TBE-Puffer, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 2,5 g Agarose sowie 10  $\mu$ l SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) ein 2,5%iges Agarosegel hergestellt.

Das Einbringen der Proben und Marker erfolgte direkt in der mit TBE-Puffer gefüllten Gelelektrophoresekammer. Dazu wurden die 96 Proben aus der 96 Well Platte zuerst mit jeweils 5  $\mu$ l Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) in der 96 Well Platte vermischt. Die Taschen des Gels wurden dann jeweils mit 10  $\mu$ l Probe bzw. 10  $\mu$ l PCR Marker (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) beladen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 120 V für ca. 1 h (Consort Electrophoresis Power Supply, 800 Series, E835, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland).

Anschließend erfolgte die Sichtbarmachung der Banden auf einem UV-Tisch (TCP-20.M, 312 nm, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland). Es wurden Photographien der Gele angefertigt, die später zur Auswertung dienten. Bei der Auswertung wurde auf die Bildung eines Produktes mit der entsprechenden Basenpaarzahl (Tabelle 4) geachtet. Reaktionsansätze mit Bildung mehrerer Produkte oder von Primerdimeren wurden ausgeschlossen.

Abbildung 11 zeigt exemplarisch zwei Agarosegele einer PCR aus TAL der Magnesiumdiättiere.



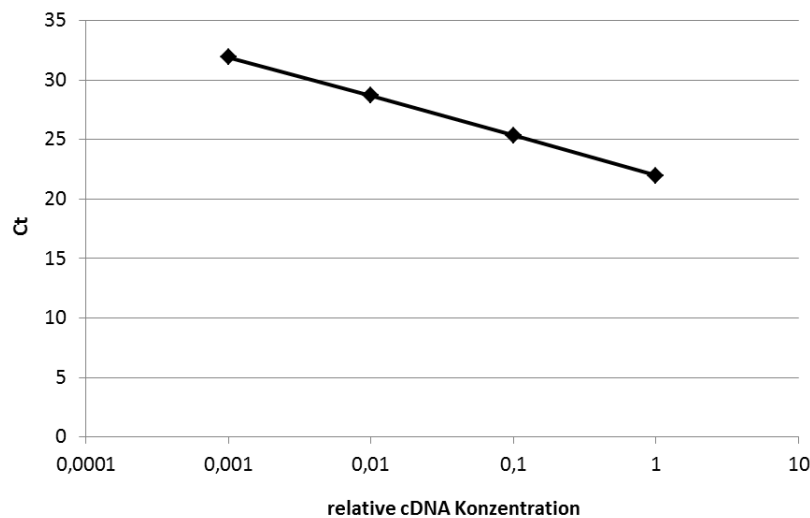
**Abbildung 11** Exemplarische Übersicht über zwei Agarosegele von real time RT-PCR Proben von Magnesiumdiätieren. M = Markerspur, auf jedem Gel jeweils einmal mit Größenangaben in Basenpaaren (bp) versehen. Die Einteilung der mit Claudin 10b, 16 und 19 und  $\beta$ -Aktin bezeichneten Abschnitte entspricht der mit Claudin 10a bezeichneten.

### 2.5.2.5 Effizienzbestimmung

Unter optimalen Reaktionsbedingungen findet pro PCR-Zyklus eine Verdopplung der DNA statt. Die Effizienz dieses Ansatzes liegt dann bei 2 bzw. 100 %. Effizienzen von Reaktionsansätzen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen können teilweise erheblich voneinander abweichen. Um Reaktionsansätze mit unterschiedlicher Zusammensetzung miteinander zu vergleichen, ist daher die Feststellung einer näherungsweise identischen Effizienz notwendig, wobei eine Differenz von 10 % zwischen den Ansätzen als akzeptabel angenommen werden kann (74). Dies gilt auch für die Nutzung von  $\beta$ -Aktin als interne Referenz.

Zur Ermittlung der tatsächlichen Effizienzen wurden Standardkurven angefertigt. Dazu wurden für jedes Primerpaar Reaktionen in Triplets angesetzt. Die cDNA stammte aus Gesamtnierenproben von Mäusen, die die Kontrolldiät erhalten hatten. Zur Anfertigung der Standardkurven der Claudin 14 Reaktionsansätze wurde cDNA aus Gesamtnierenproben von Mäusen, die Hochkalziumdiät erhalten hatten, sowie cDNA aus Mäuseleber verwandt. Die cDNA wurde der Reaktion jeweils unverdünnt und 1 : 10, 1 : 100 und 1 : 1000 zugeführt.

Die erhaltenen Ct-Werte wurden gegen die cDNA-Menge in ansteigender Konzentration in halblogarithmischer Darstellung aufgetragen (Abbildung 12).



**Abbildung 12** Relative Standardkurve zur Effizienzbestimmung von Claudin 19 mit dem Qiagen Master Mix in halblogarithmischer Darstellung

Durch die aufgetragenen Punkte wurde eine Gerade gelegt, deren Steigung ermittelt wurde. Anhand der ermittelten Steigung  $m$  ließ sich die Effizienz  $E$  gemäß folgender Formel (15) ermitteln:

$$E = 10^{-\frac{1}{m}} - 1$$

Dabei ergaben sich für die Reaktionsansätze mit den verschiedenen Primerpaaren die in Tabelle 5 aufgeführten Effizienzen.

Die Effizienzen unterschieden sich zwischen der ersten und zweiten Erhebung nicht maßgeblich und befanden sich mit einer maximalen Differenz von 10,2 % bzw. 10,9 % in der zweiten Erhebung zwischen Ziel- und Referenzgen in einem annehmbaren Bereich. Obwohl bei der ersten Erhebung keine Effizienz für den Claudin 14 Reaktionsansatz ermittelt werden konnte, wurde auf Grund der zweiten Erhebung beschlossen, die mit diesem Reaktionsansatz ermittelten Datenpunkte nicht auszuschließen.



**Tabelle 5** Für den Qiagen Master Mix und die zugehörigen Reaktionsbedingungen ermittelte Effizienzen in Prozent. \* Effizienzen konnten nur über drei Verdünnungsstufen bestimmt werden, \*\* nicht verwertbare Effizienz, da Datenerhebung nur über zwei Verdünnungsstufen möglich war, \*\*\* nicht verwertbare Effizienz, da Datenerhebung wegen Entstehung eines falschen Produktes nicht möglich war.

Primerpaar	Effizienz vor der Datenerhebung [%]	Kontrolle der Effizienz während der Datenerhebung [%]
Claudin 10a	101,6	***
Claudin 10b	97,0	94,9
Claudin 14	**	110,2*
Claudin 16	106,1*	106,8
Claudin 19	109,5*	100,3
β-Aktin	107,2	105,8

#### 2.5.2.6 Darstellung der Daten

Die Darstellung der PCR Daten zum Vergleich der Claudinexpression zwischen den unterschiedlichen Diätgruppen erfolgte als, auf die interne Referenz (β-Aktin) normalisierte, individuelle Datenpunkte gemäß folgender Formel (74):

$$2^{-\Delta Ct}$$

Dabei galt:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Claudin Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen } \beta\text{-Aktin}}$$

#### 2.5.2.7 Real time RT-PCR der TAL der Magnesiumdiättiere

Für die Erhebung der PCR Daten der TAL Proben der Mäuse, die Niedrig- und Hochmagnesium und die zugehörige Kontrolldiät erhalten hatten, wurde der Master Mix Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) mit folgendem Temperaturprogramm verwandt:

$$\left. \begin{array}{l} 95\text{ °C für 10 min} \\ 95\text{ °C für 15 s} \\ 60\text{ °C für 30 s} \\ 60\text{ °C für 30 s} \end{array} \right\} 45 \text{ Wiederholungen}$$

Für die Datenanalyse der mit dem Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix erhobenen Daten, wurde der Schwellenwert auf 0,25 festgelegt.

**Tabelle 6** Für den Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix und die zugehörigen Reaktionsbedingungen ermittelte Effizienzen in Prozent. \*\* nicht verwertbare Effizienz, da Datenerhebung nur über zwei Verdünnungsstufen möglich war.

Primerpaar	Effizienz vor der Datenerhebung [%]
Claudin 10a	80,5
Claudin 10b	87,9
Claudin 14	**
Claudin 16	90,9
Claudin 19	94,9
β-Aktin	94,5

Die Bestimmung der Effizienzen erfolgte wie im Kapitel 2.5.2.5 beschrieben vor der Datenerhebung. Dabei ergaben sich folgende Effizienzen (Tabelle 6). Die Effizienzen unterschieden sich bis auf die sehr niedrige Effizienz der Claudin 10a Ansätze nicht mehr als 6,6 % von der Effizienz des Referenzgens. Allerdings waren alle, insbesondere die Effizienzen der Claudin 10a und 10b Ansätze, eher niedrig.

## 2.6 Western Blot

### 2.6.1 Lösungen für die Nierenaufarbeitung und den Western Blot

Die für die Proteinaufarbeitung und den WB benötigten Lösungen sind in Tabelle 7 bis 15 aufgeführt.

**Tabelle 7** Rezept für fünffach konzentrierten Auftragspuffer nach Lämmli. Tris = Trisaminomethan, DTT = Dithiothreitol, SDS = Sodiumdodecylsulfat.

5x Lämmli	
Tris	300 mM
HCl (37%ig)	zur pH-Wert Einstellung auf 6,8
DTT	500 mM
SDS	10 % (w/v)
Bromphenolblau	Bis zum Farbumschlag zugeben
Glycerol (100%ig)	50 % (v/v)
	mind. 30 min mischen, davon
	10 min bei 55 °C

**Tabelle 8** Homogenisierungspuffer. Tris = Trisaminomethan, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure.

<b>Homogenisierungspuffer</b>	
NaCl	140 mM
Tris	20 mM
EDTA	5 mM
cOplete	1 Tablette/10 ml Lösung
NaOH oder HCl	zur pH-Wert Einstellung auf 7,4

cOplete in Tabelle 8 und Tabelle 9 bezeichnet eine Proteaseinhibitormischung von Roche in Tablettenform.

**Tabelle 9** Lysepuffer. Tris = Trisaminomethan, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure, SDS = Sodiumdodecylsulfat.

<b>Lysepuffer</b>	
Tris	50 mM
EDTA	5 mM
SDS	2 % (v/v)
cOplete	1 Tablette/10 ml Lösung
NaOH oder HCl	zur pH-Wert Einstellung auf 6,8

**Tabelle 10** Rezept für vierfach konzentrierten Trenngel- und vierfach konzentrierten Sammelgelpuffer. Tris = Trisaminomethan, SDS = Sodiumdodecylsulfat.

	<b>4x Trenngelpuffer</b>	<b>4x Sammelgelpuffer</b>
Tris/HCl	1,5 M	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)	0,4 % (w/v)
NaOH oder HCl	zur pH-Wert Einstellung auf 8,8	zur pH-Wert Einstellung auf 6,8

**Tabelle 11** Rezept für Trenngel (15%ig) und Sammelgel (zehnprozentig) zur Herstellung von zwei Gelen. APS = Ammoniumpersulfat, TEMED = Tetramethylethylendiamin.

	<b>15%iges Trenngel</b>	<b>10%iges Sammelgel</b>
Acrylamid (40%ig)	7,5 ml	2,5 ml
4x Gelpuffer	5,0 ml	2,5 ml
Destilliertes Wasser	7,29 ml	4,9 ml
APS	150 µl	75 µl
TEMED	60 µl	30 µl

**Tabelle 12** Rezept für Elektrodenpuffer. Tris = Trisaminomethan, SDS = Sodiumdodecylsulfat.

<b>Elektrodenpuffer</b>	
Glycin	200 mM
Tris	30 mM
SDS	0,1 % (w/v)

**Tabelle 13** Rezept für Tank-Blot-Puffer. Tris = Trisaminomethan.

<b>Tank-Blot-Puffer</b>	
Tris	20 mM
Glycin	192 mM
Methanol (100%ig)	20 % (v/v)

**Tabelle 14** Rezept für Ponceau S Färbelösung.

<b>Ponceau S Färbelösung</b>	
Essigsäure (100%ig)	1 % (v/v)
Ponceau S	9 mM

**Tabelle 15** Rezept für TBS-T. Tris = Trisaminomethan.

<b>TBS-T</b>	
Tris/HCl	80 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05 % (v/v)
NaOH oder HCl	zur pH-Wert Einstellung auf 7,6

## 2.6.2 Probengewinnung

### 2.6.2.1 Gewinnung der TAL Proben

Die Gewinnung der TAL Proben für den Western Blot wurde wie im Kapitel enzymatische Tubuluspräparation (Kapitel 2.4) beschrieben durchgeführt.

### 2.6.2.2 Gewinnung der Gesamtnierenprobe

Die Gesamtnierenprobe, die zur Normalisierung der Proteinmenge der TAL Proben diente, wurde aus einer Niere einer Claudin 10 WT Maus gewonnen, die freundlicherweise von Dr. Tilman Breiderhoff (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt worden

war. Außerdem war eine Niere einer Claudin 10 KO Maus zur Verfügung gestellt worden, die in der Optimierung des Western Blots als Negativkontrolle diente.

Die gesamte Proteinaufarbeitung erfolgte auf Eis. Zu jeder Nierenprobe wurden 4 ml Homogenisierungspuffer (Tabelle 8) hinzugefügt. Die Nieren wurden mit Hilfe des Ultra-Turrax T25 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) zerkleinert. Danach wurden die Nierenproben im Glashomogenisator mit Teflon-Pistill motorbetrieben weiter homogenisiert. Es erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei niedriger Zentrifugalbeschleunigung (zehn Minuten bei 4 °C und 1000 x g mit der TGA-65 Ultrazentrifuge, Kontron Instruments, Tegimenta AG, Rotkreuz, Schweiz). Die Überstände wurden danach abgenommen und in Ultrazentrifugationsröhrchen gesammelt. Die entstandenen Pellets wurden jeweils in 2 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Es folgte die Zentrifugation der wiederaufgelösten Pellets bei niedriger Zentrifugalbeschleunigung (zehn Minuten bei 4 °C und 1000 x g mit oben genannter Zentrifuge). Die entstandenen Überstände wurden in die entsprechenden Ultrazentrifugationsröhrchen mit den Überständen der ersten Zentrifugation überführt. Die Pellets wurden verworfen. Die fusionierten Überstände wurden für zwei Stunden bei 150000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die entstandenen Überstände wurden verworfen. Die Pellets wurden in jeweils 200 µl Lysepuffer (Tabelle 9) resuspendiert, dazu war ein erneuter Einsatz des Glashomogenisators mit Teflonpistill notwendig. Die Gesamtnierenproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung im WB bei -80 °C gelagert.

#### *2.6.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration der Gesamtnierenprobe*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) nach Herstellerangaben.

Sämtliche Standardlösungen und Proben wurden für die Messung 1 : 20 mit PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) verdünnt. Außerdem diente eine 1 : 20 Verdünnung des Lysepuffers zur Ermittlung des Leerwertes. Die Absorptionsmessung erfolgte mit einem 594 nm Filter als Endpunktmessung an einem Mikroplattenlesegerät (GENios, Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland).

#### **2.6.3 Gelelektrophorese und Transfer auf Membran**

Die Gelgießstände sowie deren Zubehör (Mini-PROTEAN Tetra handcast systems), das Elektrophorese- (Mini-PROTEAN Tetra cell), das Blotsystem und dessen Zubehör (Mini Trans-Blot Module) für den WB stammten von Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland.

Es wurden entsprechend der in Tabelle 11 aufgeführten Zusammensetzung 15%ige Trenngele mit zehnpromzentigen Sammelgelen mit jeweils zehn Auftragstaschen verwandt. Die Gele wurden in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer wurde mit Elektrodenpuffer (Tabelle 12) befüllt. Parallel wurden die Proteinproben vorbereitet. Dazu wurden jeweils sechs TAL Proben von

Mäusen, die Kontroll-, Niedrig- sowie Hochkalziumdiät erhalten hatten, sowie die Gesamtnierenprobe der Claudin 10 WT Maus bei 56 °C für 30 min gekocht. In jedem Gel wurde eine Tasche mit 5 µl Marker (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas #SM1811, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) bestückt. Weitere sechs Taschen wurden mit jeweils der gesamten Menge der TAL Probe (pro Gel jeweils zwei jeder Diätform) befüllt. Eine Tasche wurde mit 20 µg der Gesamtnierenprobe bestückt. Die Auftrennung in der Gelelektrophoresekammer erfolgte bei 80 V 220 min lang (Consort Electrophoresis Power Supply, 800 Series, E835 und E865, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Danach wurden von den Gelen die Sammelgele abgetrennt.

Zur Äquibrierung wurden die Gele, die Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,2 µm, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland), Filterpapiere und Schwämme für zehn Minuten in Tank-Blot-Puffer (Tabelle 13) gelegt. Dann wurden die Gelhalteapparaturen zusammgebaut. Dies erfolgte stets in folgender Reihenfolge (von Kathode nach Anode): zwei Schwämme, vier Filterpapiere, Gel, Nitrocellulosemembran, vier Filterpapiere, ein Schwamm. Beim Zusammenbauen wurde auf ein blasenfreies Vorgehen geachtet, eventuell entstandene Blasen wurden durch leichtes Ausstreichen mit einem Spatel entfernt.

Die Proteine wurden 75 min lang bei 500 mA auf die Nitrocellulosemembran transferiert, wobei die Apparatur zum Kühlen in Eiswasser gestellt wurde. Die Sichtbarmachung der übertragenen Proteine erfolgte mit Ponceau S Färbelösung (Tabelle 14). Danach wurde die Membran 90 min lang durch Inkubation in TBS-T (Tabelle 15) und fetalem Kälberserum (FCS) im Verhältnis 1 : 1 mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (Frema Reform, GranoVita GmbH, Heimertingen, Deutschland) blockiert.

**Tabelle 16** Antikörper für den Western Blot. HRP = horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase.

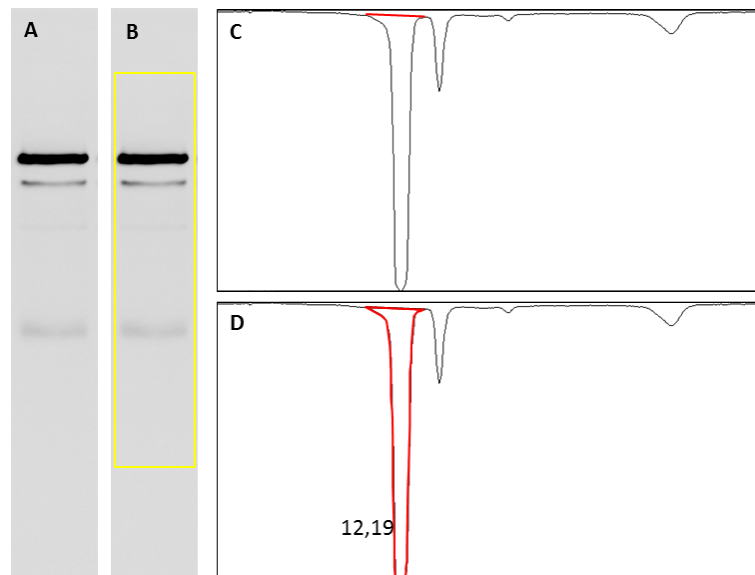
<b>Erstantikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
anti-Claudin 10	Maus	1 : 500 in 3 % (w/v) BSA in TBS-T	Invitrogen, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland, #415100
anti-β-Aktin	Kaninchen	1 : 1000 in 1 % (w/v) BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA, #4967
<b>Zweitantikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
anti-Maus IgG HRP	Schaf	1 : 5000 in 1 % (w/v) BSA in TBS-T	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland, NA 931
anti-Kaninchen IgG HRP	Ziege	1 : 50000 in 1 % (w/v) BSA in TBS-T	DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland, 111-035-144

Die Membranen wurden bei 4 °C über Nacht mit Erstantikörper (Maus anti-Claudin 10), wie in Tabelle 16 beschrieben, inkubiert. Dabei befand sich die Membran auf einem Mini Mixer (Select Bioproducts, Edison, USA), um die Membran konstant mit antikörperhaltiger Flüssigkeit zu benetzen. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal je 20 min lang in TBS-T (Tabelle 15) gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation der Membran bei Raumtemperatur 1 h lang in anti-Maus IgG HRP Antikörper (siehe Tabelle 16). Es erfolgten fünf 20-minütige Waschschrte in TBS-T, um unspezifisch gebundenen Zweitantikörper zu entfernen.

Zur Auswertung der Membranen erfolgte das Aufbringen von insgesamt 600 µl Amersham ECL Select Western blotting detection reagent (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) pro Membran, wobei die antikörpergebundene Meerrettichperoxidase das im ECL Select enthaltene Luminol oxidiert und so zu einer messbaren Chemilumineszenz führt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit dem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) mit mehreren Aufnahmen pro Membran und jeweils zunehmenden Aufnahmezeiten.

#### 2.6.4 Auswertung

Der WB wurde semiquantitativ mit Hilfe von ImageJ (Version 1.47v, National Institutes of Health, USA) ausgewertet und auf  $\beta$ -Aktin und 20 µg Nierenprotein normalisiert. Die generierten Bilder wurden zuerst in Graustufenbilder umgewandelt.



**Abbildung 13** Erklärungen zur Vorgehensweise in ImageJ. **A** Ausschnitt aus einem  $\beta$ -Aktin gefärbten Blot. **B** Markierung der gezeigten Spur mit einem gelben Rechteck. **C** Von ImageJ generierte Abbildung, die die Intensität der im gelben Rechteck markierten Pixel zeigt. **D** Markierung der interessierenden Fläche. Die Zahl (12,19) gibt den Anteil der markierten Fläche in Bezug auf alle markierten Flächen der verschiedenen Spuren eines Blots in Prozent an.

Dann wurde die erste Spur des Gels mit einem Rechteck markiert (siehe gelbes Rechteck in Abbildung 13 B). Über die Menüfunktion Analyze > Gels > Select First Lane, wurde dieses Rechteck als erste Spur definiert. Durch diesen Befehl generierte ImageJ ein zweites Rechteck. Dieses wurde zur Markierung der zweiten Spur genutzt und nach der korrekten Positionierung über die Menüfunktion Analyze > Gels > Select Next Lane als weitere Spur gekennzeichnet. Auf diese Weise wurden auch alle anderen Spuren des Bildes gekennzeichnet. Über die Menüfunktion Analyze > Gels > Plot Lanes generierte ImageJ pro Spur eine Abbildung, die die Intensität der Pixel des markierten Rechtecks darstellt (Abbildung 13 C). Die Abszisse zeigt dabei die Distanz entlang der längeren Seite des Rechtecks an, die Ordinate die Intensität der Pixel. Mit einer Linie wurde in den Abbildungen der Hintergrund manuell abgeschnitten (rote Linie in Abbildung 13 C).

Dann erfolgte die Markierung der die Bande repräsentierenden Flächen (rot markierte Fläche in Abbildung 13 D) für alle angezeigten Abbildungen. Über die Menüfunktion Analyze > Gels > Label Peak errechnete das Programm daraus den prozentualen Anteil der Bande an allen markierten Banden, wobei alle Banden einer Färbung auf einem Gel zusammen 100 % ergaben.

Auf diese Weise wurden jeweils die Bilder für die  $\beta$ -Aktin und Claudin 10 gefärbten Western Blots ausgewertet. Die normalisierte Claudin 10 - zur normalisierten  $\beta$ -Aktin-Menge wurde folgenderweise berechnet:

$$\frac{\text{prozentualer Anteil}_{\text{Claudin 10 TAL}}}{\text{prozentualer Anteil}_{\text{Claudin 10 Niere}}} : \frac{\text{prozentualer Anteil}_{\beta\text{-Aktin TAL}}}{\text{prozentualer Anteil}_{\beta\text{-Aktin Niere}}}$$

Dabei ergab sich ein Wert von 1 für die auf  $\beta$ -Aktin normalisierte Gesamtnierenprobe.

## 2.7 Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Darstellung der Lokalisierung der Claudine erfolgten Immunfluoreszenzfärbungen von Nierenkryoschnitten.

### 2.7.1 Antikörper und Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbungen

**Tabelle 17** Blockierlösung für die Färbung unfixierter Nierenschnitte. Fetales Kälberserum von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich.

<b>Blockierlösung</b>	
Fetales Kälberserum	10 % (v/v)
Tween 20	0,2 % (v/v)
in kalzium- und magnesiumfreiem PBS	



Tabelle 17 zeigt die Zusammensetzung der, für die Färbung unfixierter Nierenschnitte verwandten Blockierlösung.

In Tabelle 18 findet sich eine Auflistung der für die Immunfluoreszenz verwandten Antikörper.

**Tabelle 18** Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwandten Erst- und Zweitantikörper. Die mit \* gekennzeichneten Antikörper wurden auch in den unfixierten Nieren angewandt.

<b>Erstantikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Hersteller</b>
anti-Claudin 2	Kaninchen	1 : 200	1 Nacht	Invitrogen, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland, #516100
anti-Claudin 10	Maus	1 : 300	1 Nacht	Invitrogen, #415100
anti-Claudin 14 *	Kaninchen	1 : 300	1 Nacht	Dr. Jianghui Hou, Washington University Renal Division, St. Louis, MO, USA
anti-Claudin 16	Kaninchen	1 : 300	1 Nacht	Dr. Jianghui Hou
anti-Claudin 19	Kaninchen	1 : 300	1 Nacht	Dr. Jianghui Hou
anti-Occludin	Maus	1 : 200	1 Nacht	Invitrogen, #331500
anti-NKCC 2 *	Meerschwein	1 : 100	1 Nacht	Dr. Kerim Mutig, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland
anti-TRPV5 *	Ziege	1 : 100	1 Nacht	Abcam, Cambridge, UK, #77351
anti-B1-V-ATPase *	Huhn	1 : 800	1 Nacht	Dr. Teodor Paunescu, Massachusetts General Hospital, Division of Nephrology, Boston, MA, USA
anti-AE1	Meerschwein	1 : 200	1 Nacht	Dr. Carsten Wagner, Physiologisches Institut, Zürich, Schweiz

Zweitantikörper	Wirt	Verdünnung	Inkubationszeit	Hersteller
Alexa Fluor 594 anti-Kaninchen IgG *	Ziege	1 : 600	1 Stunde	Molecular Probes, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Alexa Fluor 594 anti-Ziege IgG *	Esel	1 : 600	1 Stunde	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 anti-Maus IgG	Ziege	1 : 600	1 Stunde	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 anti-Meerschwein IgG *	Ziege	1 : 600 (1 : 800*)	1 Stunde	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen IgG *	Esel	1 : 600	1 Stunde	Molecular Probes
Alexa Fluor 488 anti-Huhn IgG *	Ziege	1 : 400	1 Stunde	Molecular Probes

Ich danke Dr. Jianghui Hou, Washington University Renal Division, St. Louis, MO, USA, Dr. Kerim Mutig, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland, Dr. Teodor Paunescu, Massachusetts General Hospital, Division of Nephrology, Boston, MA, USA sowie Dr. Carsten Wagner, Physiologisches Institut, Zürich, Schweiz für die freundliche Zurverfügungstellung der oben näher bezeichneten Antikörper.

In Tabelle 19 findet sich eine Auflistung der farbstoffspezifischen Fluoreszenzeigenschaften.

**Tabelle 19** Spezifizierung der in den Immunfluoreszenzfärbungen angewandten Farbstoffe. Die Angaben in der Tabelle entsprechen den Herstellerangaben. DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, von Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland.

Name des Farbstoffs	Absorptionswellenlänge [nm]	Wellenlänge der maximalen Fluoreszenz [nm]
DAPI	364	454
Alexa Fluor 488	491-501	513-523
Alexa Fluor 594	586-596	612-622

## **2.7.2 Entnahme der Nieren**

Die Mäuse, deren Nieren für die Immunfluoreszenzfärbungen weiterverarbeitet wurden, entstammten der in Kapitel 2.2 erwähnten Population. Am achten Tag der Diätfuttergabe erfolgte die Narkotisierung der Mäuse (wie in Kapitel 2.4 beschrieben).

### *2.7.2.1 PFA perfusionsfixierte Nieren*

Nach der Eröffnung des Brustkorbes erfolgten das Einschneiden des rechten Vorhofs zur Druckentlastung des Gefäßsystems und die Punktion der linken Herzkammer mit bereits an das entlüftete Perfusionssystem angeschlossener Kanüle. Die Perfusion erfolgte direkt im Anschluss aus einem offenen Spritzensystem, das in ungefähr zwei Meter Höhe oberhalb der Maus angebracht war. Als erstes wurden über dieses System 10 ml einer PBS Lösung mit 1 % (v/v) Procain infundiert, danach 15 bis 20 ml einer PBS Lösung mit 1 % (v/v) Procain und 4 % (v/v) PFA. Anschließend erfolgte die Entnahme der Nieren.

Die Nieren wurden dekapsuliert und in einige Millimeter dicke Keile geschnitten, wobei die Ausrichtung der Schnittführung etwa parallel zum Verlauf der Tubuli in der IM war. Die Pole der Niere wurden nicht weiterverarbeitet. Die Nierenkeile wurden bei Raumtemperatur zwei bis drei Stunden lang in PBS mit 4 % (v/v) PFA belassen. Danach wurden sie über Nacht bei Raumtemperatur in PBS mit 20 % (w/v) Saccharose eingelegt.

Aus Aluminiumfolie wurden kleine Förmchen hergestellt. In diese wurde pro Förmchen jeweils ein Nierenkeil mit einer Schnittfläche nach unten hineingelegt und mit Einbettmedium (Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) aufgefüllt. Zum Einfrieren wurden die gefüllten Aluförmchen in flüssigen Stickstoff gelegt und danach bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### *2.7.2.2 Unfixierte Nieren*

Nach der Dekapitation der Maus erfolgten die zügige Eröffnung des Bauchraums und die Entnahme der Nieren. Jede Niere wurde von ihrer Kapsel befreit, in transversaler Schnittführung halbiert und bei -20 °C eingefroren.

## **2.7.3 Färbevorgang**

Aus den gefrorenen Nieren wurden im Kryostaten (Research Cryostat Leica CM3050, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) 3 µm dicke Nierenschnitte gewonnen. Die unfixierten Nieren wurden im Kryostaten auf einem Metallstempel in Einbettmedium eingebettet. Das Schneiden erfolgte bei einer Kammertemperatur von -19 bis -20 °C (PFA perfusionsfixierte Nieren) sowie -18 °C (unfixierte Nieren). Die individuell einstellbare Kühlung der Nieren wurde für die PFA perfusionsfixierten Nieren bei -19 bis -20 °C eingestellt, für die unfixierten Nieren bei -17 °C. Die

Schnitte wurden direkt auf mit einem Haftstoff beschichtete Objektträger (Polysine Slides, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht. Bis zur Färbung wurden die bestückten Objektträger bei -20 °C gelagert.

#### 2.7.3.1 PFA perfusionsfixierte Nieren

Die bestückten Objektträger wurden zur Antigendemaskierung zehn Minuten lang bei -20 °C in eine Küvette mit Methanol und Aceton im Verhältnis 7 : 3 gestellt. Es wurde darauf geachtet, die Objektträger ab diesem Zeitpunkt stets feucht zu halten. Danach wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend acht Minuten lang zur weiteren Antigendemaskierung in Zitratpuffer (10 mM Zitronensäuremonohydrat, pH 6) in der Mikrowelle sprudelnd gekocht. Nachdem die Objektträger abgekühlt waren, wurden sie jeweils zehn Minuten lang dreimal in PBS mit 0,3 % (w/v) Triton (PBS-T) gewaschen. In einer feuchten Kammer erfolgte die Inkubation der Nierenschnitte gemäß der Zeitangabe in Tabelle 18 bei 4 °C. Dazu wurden die Erstantikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 18) in 50 µl PBS-T mit 1 % (w/v) BSA pro Objektträger angesetzt und auf die Niere pipettiert. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Objektträger mit Deckgläschen bestückt. Nach der Inkubation erfolgten die Entfernung der Deckgläschen und ein erneutes, jeweils zehnminütiges dreimaliges Waschen mit PBS-T. Die Zweitantikörper wurden entsprechend der Verdünnung in Tabelle 18 in 100 µl PBS-T mit 1 % (w/v) BSA pro Objektträger angesetzt und auf die gewaschenen Nierenschnitte gegeben. Die Inkubationsdauer richtete sich nach den Angaben in Tabelle 18 und erfolgte in einer verdunkelten feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Objektträger erneut dreimal jeweils zehn Minuten lang in PBS-T gewaschen. Das Eindecken erfolgte mit Mowiol/DAPKO (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und 0,1 % (v/v) DAPI. Dazu wurden jeweils ungefähr 50 µl Eindeckmedium auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen blasenfrei abgedeckt. Das Aushärten geschah über Nacht an einem dunklen Ort.

#### 2.7.3.2 Unfixierte Nieren

Die Nierenschnitte wurden zum Fixieren und zur Antigendemaskierung bei -20 °C zwanzig Minuten lang in Methanol gestellt. Danach erfolgte ein zehnminütiger Waschschrift in Blockierlösung (Tabelle 17). Die Erstantikörper wurden entsprechend der in Tabelle 18 angegebenen Verdünnung in 50 µl Blockierlösung je Objektträger angesetzt und auf die Nierenschnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte gemäß der Zeitangabe in Tabelle 18 bei 4 °C. Dazu wurden die Objektträger, um eine Austrocknung zu vermeiden, mit Deckgläschen abgedeckt. Die Deckgläschen wurden entfernt und die Objektträger dreimal für jeweils zehn Minuten in Blockierlösung (Tabelle 17) gewaschen. Die entsprechenden Zweitantikörper wurden in 100 µl Blockierlösung je Objektträger angesetzt und auf

die Nierenschnitte pipettiert. Gemäß der Zeitangabe in Tabelle 18 erfolgte die Inkubation in Zweitantikörper bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten, feuchten Kammer. Es folgten drei Waschschriffe von je zehn Minuten in Blockierlösung sowie ein nachfolgender zehnmünütiger in PBS. Das Eindecken glich dem Eindecken der PFA perfusionsfixierten Nierenschnitte.

#### 2.7.4 Auswertung

Die Auswertung der gefärbten Nierenschnitte erfolgte an einem inversen Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Dabei waren die in Tabelle 20 aufgeführten Filtersets eingebaut.

**Tabelle 20** Auflistung der im Mikroskop verwandten Filtersets. Alle stammen von Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland.

<b>Name des Filtersets</b>	<b>Wellenlänge [nm], die den Anregungsfilter passieren kann</b>	<b>Dichroischer Spiegel Wellenlänge [nm], die reflektiert wird</b>	<b>Wellenlänge [nm], die den Emissionsfilter passieren kann</b>
02E (DAPI)	325-405	< 395	> 420
52HE	483-493	< 500	500-550
64HE	574-600	< 605	612-682

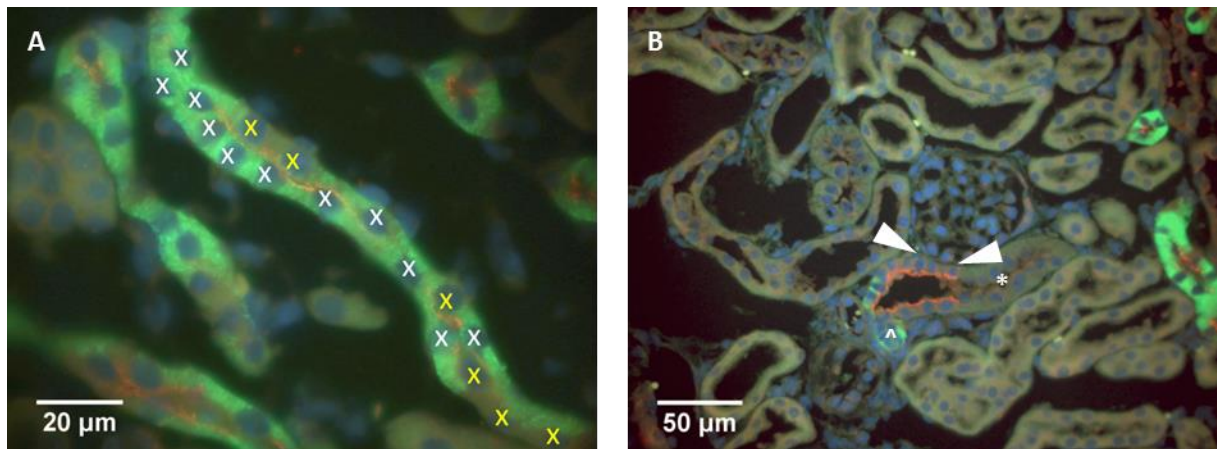
Beim Mikroskopieren wurde zum einen auf die grundsätzliche Verteilung der gefärbten Claudine und des Occludins entlang des Nephrons in Nierenschnitten von Mäusen, die Kontrolldiät erhalten hatten, geachtet. Außerdem wurde das Färbeverhalten der unterschiedlichen Nephronsegmente vergleichend zwischen den Diätgruppen betrachtet. Dabei wurde zum einen nach qualitativen Gesichtspunkten der Anteil des entsprechenden Nephronsegments mit TJ Färbung, zum anderen die Ausdehnung der TJ Färbung beurteilt. Außerdem erfolgte die subjektive Beurteilung der Stärke der TJ Färbung am Mikroskop nach quantitativen Gesichtspunkten.

Bei der zur Aufnahme von Bildern verwandten Kamera handelte es sich um eine ProgRes CF (Jenoptik Optical Systems GmbH, Jena, Deutschland). Die Bilder wurden mit dem folgenden Programm aufgenommen: ProgRes Capture Pro Version 2.8.0 (Jenoptik Optical Systems GmbH, Jena, Deutschland). Die in Abbildung 22 C und D gezeigten Bilder wurden mit dem LSM 510 Modul desselben Mikroskops aufgenommen.

##### 2.7.4.1 Zählung Claudin 10 gefärbter Zellen in TAL

Von je drei Kontroll- und Hochkalziumdiätieren, die Claudin 10, Claudin 16 und DAPI gefärbt worden waren, wurden Bilder von jeweils 20 längsgeschnittenen TAL aus Kortex und OSOM aufgenommen. Der ISOM wurde von der Betrachtung ausgenommen, da hier keine intrazellulären

Färbungsunterschiede zwischen den Zellen zu erkennen waren. TAL ab einer Länge von acht Zellkernen wurden berücksichtigt.



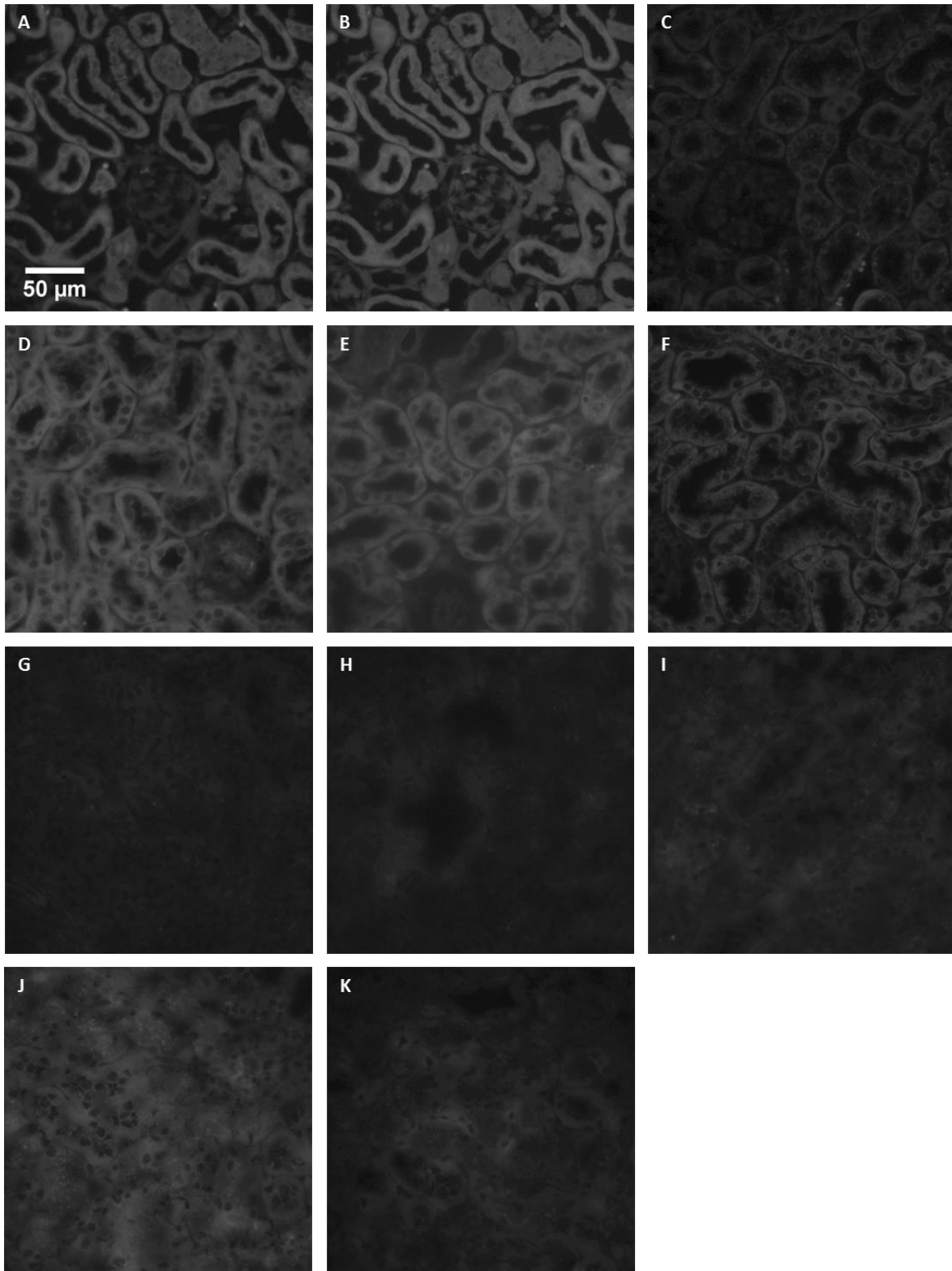
**Abbildung 14** Claudin 10 (grün), Claudin 16 (rot) und DAPI gefärbte Niere. **A** Beispielhafte Darstellung einer Kontrolldiät-Niere weiße X markieren Zellkerne von intrazellulär Claudin 10 gefärbten Zellen, gelbe X markieren Zellkerne von intrazellulär nicht Claudin 10 gefärbten Zellen **B** Macula densa. Pfeilspitzen deuten auf Macula densa. ^ = TAL, \* = DCT.

Bei der Aufnahme der Bilder wurden einheitliche Belichtungszeiten von 180 ms für das Filterset 52HE, 110 ms für das Filterset 64HE sowie 40 ms für das Filterset 02E gewählt. Die Aufnahmen mit den Filtersets 52HE und 64HE erfolgten mit 50%igem Graufilter, die mit dem Filterset 02E mit 75%igem Graufilter. Die Zählung der Zellen erfolgte am Fusionsbild, an dem keine weiteren Anpassungen vorgenommen worden waren. Die um den jeweiligen Zellkern liegende Region wurde betrachtet und der Zellkern wurde entsprechend der vorhandenen Färbung markiert (Abbildung 14 A).

Bei der Zählung wurden randständige nicht Claudin 10 gefärbte Zellen ausgeschlossen, es sei denn, es war eine zelltypische Hintergrundfärbung zu erkennen. Die Macula densa wurde von der Betrachtung ausgenommen, da hier regelmäßig keine Claudin 10 Färbung vorlag (Abbildung 14 B).

### 2.7.5 Negativkontrollen ohne Erstantikörper

Zum Ausschluss einer eventuellen unspezifischen Zweitantikörperbindung wurden Negativkontrollen in Nierenschnitten von Mäusen, die Kontrolldiät erhalten hatten, für alle in Tabelle 18 aufgelisteten Zweitantikörper durchgeführt. Dabei wurden sowohl PFA perfusionsfixierte als auch unfixierte Nierenschnitte gefärbt. Das Vorgehen entsprach dem in Kapitel 2.7.3 beschriebenen, wobei die Inkubation mit Erstantikörper wegfiel. Der Zweitantikörper wurde direkt nach den ersten Waschschritten aufgetragen. Die angewandten Zweitantikörper entsprachen den in Tabelle 18 aufgeführten. Außerdem wurden Aufnahmen von komplett unbehandelten Nierenschnitten als Negativkontrollen angefertigt.



**Abbildung 15** Negativkontrollen ohne Antikörper (A und B) bzw. ohne Erstantikörper (C-K). Der in Abbildung A gezeigte Größenbalken gilt ebenso für Abbildung B-K. Abbildung A-F zeigt PFA fixierte Nierenschnitte, Abbildung G-K unfixierte Schnitte. Die Belichtungszeiten für Aufnahmen von Alexa Fluor 594 mit dem Filterset 64HE betragen bei allen Bildern dieser Abbildung 120 ms, für Alexa Fluor 488 mit dem Filterset 52HE 80 ms. Die angewandten Zweitantikörper entsprechen den in Tabelle 18 aufgeführten. A Aufnahme ohne Antikörper mit dem Filterset 64HE B Aufnahme ohne Antikörper mit dem Filterset 52HE C Alexa Fluor 594 Ziege anti-Kaninchen IgG D Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG E Alexa Fluor 488 Ziege anti-Huhn IgG F Alexa Fluor 488 Ziege anti-Meerschwein IgG G Alexa Fluor 488 Ziege anti-Huhn IgG H Alexa Fluor 488 Ziege anti-Meerschwein IgG I Alexa Fluor 594 Ziege anti-Kaninchen IgG J Alexa Fluor 594 Esel anti-Ziege IgG K Alexa Fluor 488 Esel anti-Kaninchen IgG

Die Aufnahmen wurden mit den oben genannten Komponenten angefertigt, wobei die Belichtungszeiten für die Negativkontrollen konstant gehalten wurden. Für Aufnahmen von Alexa Fluor 594 mit dem Filterset 64HE betrug sie bei allen Bildern 120 ms, für Alexa Fluor 488 mit dem Filterset 52HE 80 ms.

Die Kontrollen zeigten eine gewisse Autofluoreszenz (Abbildung 15 A und B), jedoch keine spezifische Färbung (Abbildung 15 C bis K).

## 2.8 Statistik

Die in den Säulendiagrammen dargestellten Daten entsprechen den arithmetischen Mittelwerten der jeweiligen Stichproben. Abweichungen vom Mittelwert wurden als Standardfehler des arithmetischen Mittels ( $sem = \text{standard error of the mean}$ ) angegeben.

Zur Anwendung der statistischen Tests wurde die Software „RStudio“ (R Version 3.1.2014-04-05, RStudio Version 0.98.953) genutzt. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf  $p$  kleiner als 0,05 festgelegt. Daten, die das Signifikanzniveau erreichten, sind im Ergebnisteil mit \* gekennzeichnet.

Betrug die Stichprobengröße kleiner gleich fünf in einer der zu vergleichenden Gruppen wurde mittels Mann-Whitney-U Test auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. Alle Stichproben größer gleich sechs wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf eine mögliche Normalverteilung der Daten untersucht. Konnte in einer oder beiden der zu vergleichenden Gruppen nicht von einer normalverteilten Grundgesamtheit ausgegangen werden, wurden die Daten mittels Mann-Whitney-U Test auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. Die Daten, bei denen in beiden zu vergleichenden Gruppen von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurden einer Varianzanalyse mittels Levene-Test unterzogen. Konnte eine Varianzhomogenität angenommen werden, wurden die Daten mittels Zweistichproben-t-Test auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht, bei Varianzheterogenität mittels Welch-Test. Zur Vermeidung einer Alphafehler-Kumulierung erfolgte die Anpassung der erhobenen  $p$ -Werte mittels schrittweiser Holm-Bonferroni Korrektur für die entsprechende Anzahl der Diätgruppen (61). Angaben zu den  $p$ -Werten im Ergebnisteil beziehen sich auf die korrigierten  $p$ -Werte.

Die statistische Auswertung der PCR-Daten erfolgte nach der Berechnung der  $2^{-\Delta Ct}$  Werte (74).

Für die Immunfluoreszenzdaten wurden aus den ordinalskalierten Expressionsanalysen die Mediane gebildet.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Elektrolythaushalt unter veränderter Kalzium- und Magnesiumzufuhr

##### 3.1.1 Veränderte Kalziumzufuhr

Die physiologische Antwort des Organismus und der Niere auf eine veränderte Kalziumzufuhr wurde mit drei Diätgruppen untersucht. Die Tiere erhielten dabei entweder eine Kontroll-, eine Niedrigkalzium- oder eine Hochkalziumdiät.

In Bezug auf Gewicht und Körperlänge sowie BMI unterschieden sich die Tiere der verschiedenen Diätgruppen nicht. Alle Tiere entwickelten sich unter der Diät normal, wie die Tiere der Kontrolldiät. Die Nierenretentionsparameter Kreatinin und Harnstoff im Plasma waren in allen Diätgruppen mit denen der Kontrolldiät vergleichbar.

Die metabolischen Daten der Kalziumdiättiere sind in Tabelle 21 ausführlich dargestellt.

**Tabelle 21** Übersicht der Plasma- und Urinwerte der Kalziumdiättiere.  $Urin_{Krea}$  = Kreatininkonzentration im Urin. \*  $p < 0,05$  Kalziumdiäten vs. Kontrolldiät. In Klammern ist die für den entsprechenden Parameter in die Auswertung eingegangene Stichprobengröße (n-Zahl) angegeben.

	Niedrigkalzium -diät (n)	Kontrolldiät (n)	Hochkalzium- diät (n)
<b>Plasma</b>			
Na <sup>+</sup> [mM]	155,3 ± 3,6 (7)	152,9 ± 0,9 (8)	151,0 ± 1,1 (8)
K <sup>+</sup> [mM]	4,37 ± 0,13 (7)	4,17 ± 0,11 (8)	4,53 ± 0,14 (8)
Cl <sup>-</sup> [mM]	112,8 ± 2,3 (7)	109,6 ± 0,7 (8)	<b>107,1 ± 0,4*(8)</b>
Ca <sup>2+</sup> [mM]	2,22 ± 0,02 (6)	2,28 ± 0,02 (8)	<b>2,41 ± 0,04*(7)</b>
Mg <sup>2+</sup> [mM]	1,01 ± 0,06 (6)	0,97 ± 0,02 (8)	0,99 ± 0,03 (7)
Phosphat [mM]	2,42 ± 0,16 (6)	2,66 ± 0,25 (8)	2,89 ± 0,28 (7)
Harnstoff [mM]	9,6 ± 0,8 (7)	11,1 ± 5,1 (8)	9,72 ± 0,6 (8)
Kreatinin [μM]	9,4 ± 0,4 (6)	9,5 ± 0,5 (8)	9,4 ± 0,5 (7)
Hämatokrit [%]	44,4 ± 1,2 (7)	43,8 ± 1,5 (8)	45,9 ± 0,7 (8)

	Niedrigkalzium- diät (n)	Kontrolldiät (n)	Hochkalzium- diät (n)
<b>Urin</b>			
Kreatinin [mM]	2,5 ± 0,6 (6)	3,1 ± 0,3 (7)	2,5 ± 0,3 (7)
Urin <sub>Na<sup>+</sup></sub> /Urin <sub>Krea</sub>	123,5 ± 35,1 (6)	49,1 ± 8,9 (7)	55,7 ± 8,1 (8)
Urin <sub>K<sup>+</sup></sub> /Urin <sub>Krea</sub>	91,9 ± 11,6 (6)	94,0 ± 13,8 (7)	91,5 ± 12,2 (8)
Urin <sub>Cl<sup>-</sup></sub> /Urin <sub>Krea</sub>	71,2 ± 20,8 (6)	43,4 ± 8,5 (7)	51,8 ± 8,0 (8)
Urin <sub>Ca<sup>2+</sup></sub> /Urin <sub>Krea</sub>	0,8 ± 0,1 (5)	1,2 ± 0,2 (7)	<b>4,9 ± 0,7*(8)</b>
Urin <sub>Mg<sup>2+</sup></sub> /Urin <sub>Krea</sub>	21,2 ± 1,5 (5)	18,3 ± 2,2 (7)	15,9 ± 1,5 (8)
Urin <sub>Phosphat</sub> /Urin <sub>Krea</sub>	<b>98,7 ± 15,2*(5)</b>	43,5 ± 5,2 (7)	<b>19,6 ± 2,9*(8)</b>
Osmolyte [mM]	2163 ± 334 (5)	2273 ± 156 (7)	1737 ± 175 (8)
<b>Fraktionelle Exkretionen</b>			
FE Natrium [%]	0,8 ± 0,2 (6)	0,3 ± 0,1 (7)	0,4 ± 0,1 (7)
FE Kalium [%]	20,2 ± 2,7 (6)	20,8 ± 2,2 (7)	16,8 ± 1,2 (7)
FE Chlorid [%]	0,6 ± 0,2 (6)	0,4 ± 0,1 (7)	0,4 ± 0,1 (7)
FE Kalzium [%]	0,3 ± 0,02 (5)	0,5 ± 0,09 (7)	<b>2,0 ± 0,37*(7)</b>
FE Magnesium [%]	19,5 ± 1,7 (5)	17,4 ± 1,6 (7)	14,7 ± 1,2 (7)
FE Phosphat [%]	<b>35,6 ± 4,5*(5)</b>	16,0 ± 1,8 (7)	<b>6,4 ± 1,3*(7)</b>
FE Harnstoff [%]	49,4 ± 3,5 (5)	46,6 ± 5,4 (7)	45,6 ± 2,4 (7)

### 3.1.1.1 Auswirkungen der Niedrigkalziumdiät

Die Mäuse, die die Niedrigkalziumdiät erhalten hatten, konnten ihre Plasmakalziumkonzentration trotz der niedrigeren oralen Kalziumzufuhr konstant halten (2,22 mM; Kontrolldiättiere 2,28 mM). Auch die anderen bestimmten Plasmakonzentrationen, insbesondere die Phosphat- und Magnesiumkonzentration, zeigten im Vergleich zur Kontrolldiät keine Abweichungen (Tabelle 21).

Erwartungsgemäß zeigten die Tiere der Niedrigkalziumdiät eine tendenziell verminderte FE Kalzium (0,3%; Kontrolldiättiere 0,5 %) sowie eine erhöhte Phosphatausscheidung. Diese adäquate physiologische Reaktion auf PTH zeigte sich sowohl in einer gesteigerten Phosphatkonzentration im Urin (normalisiert auf die Kreatininkonzentration im Urin), als auch in einer gesteigerten FE Phosphat (35,6%; Kontrolldiättiere 16,0 % (Tabelle 21)).

Bei unveränderter Natriumkonzentration im Plasma zeigten die Niedrigkalziumdiättiere eine tendenziell erhöhte Natriumausscheidung im Urin (um den Faktor 2,5; normalisiert auf die Kreatininkonzentration im Urin).

### 3.1.1.2 Auswirkungen der Hochkalziumdiät

Die Mäuse der Hochkalziumdiätgruppe zeigten eine im Vergleich zur Plasmakonzentration der Kontrolldiättiere erhöhte Kalziumkonzentration im Plasma (2,41 mM; Kontrolldiättiere 2,28 mM) (Tabelle 21), d. h. die Gegenregulation im Rahmen der erhöhten oralen Kalziumaufnahme waren nicht ausreichend um die Plasmakalziumkonzentration stabil zu halten. Zusätzlich zeigte sich eine verminderte Chloridkonzentration im Plasma der Tiere (107,1 mM; Kontrolldiättiere 109,6 mM). Die weiteren bestimmten Plasmaparameter der Hochkalziumdiättiere wiesen keine Auffälligkeiten auf. Die erhöhte renale Kalziumausscheidung zeigte sich sowohl in einer erhöhten Kalziumkonzentration im Urin (normalisiert auf die Kreatininkonzentration im Urin) als auch in einer erhöhten FE Kalzium (2,0 %; Kontrolldiättiere 0,5 % (Tabelle 21)). Die PTH Suppression war sichtbar in einer verminderten Phosphatausscheidung ( $\text{Urin}_{\text{Phosphat}}/\text{Urin}_{\text{Kreatinin}} = 98,7$ ; Kontrolldiättiere 43,5; FE Phosphat = 6,44 %; Kontrolldiättiere 16,0 % (Tabelle 21)). Zudem war die Osmolytkonzentration im Urin mit 1737 mM (Kontrolldiättiere 2273 mM) tendenziell erniedrigt.

### 3.1.2 Veränderte Magnesiumzufuhr

In einem zweiten Versuch wurden drei weitere Diätgruppen mit veränderter Magnesiumzufuhr untersucht. Hierzu erhielten die Tiere entweder eine Kontroll-, eine Niedrig- oder Hochmagnesiumdiät. Diese Tiere waren in allen Diätgruppen etwa 20 Tage jünger als die Tiere der Kalzium- und Phosphatdiäten (Tiere der Kontrolldiätgruppe der Magnesiumdiäten = 41 d; Kontrolldiättiere der Kalzium- und Phosphatdiäten = 63 d). Die Tiere der Magnesiumdiäten zeigten bei gleicher Körperlänge und geringfügig geringerem Körpergewicht einen erniedrigten BMI. Auf Grund des Altersunterschiedes und den sich daraus ergebenden Unterschieden in der körperlichen Entwicklung werden die beiden Versuche voneinander getrennt beschrieben.

In Bezug auf Gewicht und Körperlänge sowie BMI unterschieden sich die Tiere der Niedrigmagnesiumdiät nicht von den Tieren der zugehörigen Kontrolldiät. Die Tiere der Niedrigmagnesiumdiät entwickelten sich unter der Diät normal. Die Kreatininkonzentration im Plasma war mit der der Kontrolldiättiere vergleichbar.

Die Tiere der Hochmagnesiumdiät entwickelten unter der Diät einen sehr weichen und wasserreichen Stuhl. Dieser Befund war offensichtlich und wurde nicht weiter quantifiziert. Die Tiere der Hochmagnesiumdiät waren sowohl leichter (15,1 g; Kontrolldiättiere 16,8 g), als auch kürzer (8,4 cm; Kontrolldiättiere 8,7 cm). Der BMI der Hochmagnesiumdiättiere war auf Grund der Einschränkung von Gewichts- und Längenzunahme jedoch mit dem der anderen Tiere der Magnesiumdiäten vergleichbar. Die Nierenretentionsparameter waren in Bezug zur Kontrolldiättiergruppe unauffällig. Die Mäuse der Hochmagnesiumdiät zeigten keine Verhaltensauffälligkeiten.

**Tabelle 22** Übersicht der Plasma- und Urinwerte der Magnesiumdiättiere.  $U_{\text{Krea}}$  = Kreatininkonzentration im Urin. <sup>a</sup> vier weitere Phosphatkonzentrationen im Urin lagen mit  $<9,6$  mM unterhalb des Messbereichs. <sup>b</sup> kein Wert vorhanden auf Grund fehlender Urin Phosphatkonzentrationen. \*  $p < 0,05$  Magnesiumdiäten vs. Kontrolldiät. In Klammern ist die für den entsprechenden Parameter in die Auswertung eingegangene Stichprobengröße (n-Zahl) angegeben.

	Niedrigmagnesium- diät (n)	Kontrolldiät (n)	Hochmagnesium- diät (n)
<b>Plasma</b>			
Na <sup>+</sup> [mM]	152,4 ± 1,0 (8)	151,0 ± 1,3 (7)	149,4 ± 0,9 (8)
K <sup>+</sup> [mM]	4,28 ± 0,1 (8)	4,28 ± 0,17 (7)	4,63 ± 0,1 (8)
Cl <sup>-</sup> [mM]	109,8 ± 1,1 (8)	109,0 ± 1,4 (7)	105,5 ± 1,2 (8)
Ca <sup>2+</sup> [mM]	<b>2,30 ± 0,02*(8)</b>	2,37 ± 0,03 (6)	<b>2,12 ± 0,03*(8)</b>
Mg <sup>2+</sup> [mM]	<b>0,53 ± 0,03*(8)</b>	0,96 ± 0,03 (7)	<b>2,20 ± 0,06*(8)</b>
Phosphat [mM]	2,38 ± 0,10 (8)	2,50 ± 0,08 (7)	2,15 ± 0,23 (8)
Harnstoff [mM]	<b>10,9 ± 0,2*(8)</b>	9,0 ± 0,6 (7)	9,82 ± 0,4 (8)
Kreatinin [μM]	9,1 ± 0,3 (8)	8,5 ± 0,4 (7)	9,0 ± 0,5 (8)
Hämatokrit [%]	46,5 ± 0,4 (8)	46,5 ± 0,7 (7)	44,5 ± 0,7 (7)
<b>Urin</b>			
Kreatinin [mM]	3,0 ± 0,5 (8)	2,4 ± 0,6 (5)	2,0 ± 0,2 (5)
Urin <sub>Na<sup>+</sup></sub> /Urin <sub>Krea</sub>	56,6 ± 19,7 (8)	60,6 ± 16,1 (4)	30,4 ± 4,6 (3)
Urin <sub>K<sup>+</sup></sub> /Urin <sub>Krea</sub>	121,2 ± 15,1 (8)	96,2 ± 33,0 (5)	126,5 ± 31,4 (5)
Urin <sub>Cl<sup>-</sup></sub> /Urin <sub>Krea</sub>	59,0 ± 19,4 (6)	44,8 ± 13,1 (4)	102,1 ± 22,1 (5)
Urin <sub>Ca<sup>2+</sup></sub> /Urin <sub>Krea</sub>	<b>0,1 ± 0,02*(8)</b>	2,1 ± 0,72 (5)	<b>5,6 ± 0,7*(5)</b>
Urin <sub>Mg<sup>2+</sup></sub> /Urin <sub>Krea</sub>	<b>0,7 ± 0,1*(8)</b>	21,0 ± 3,0 (5)	<b>73,1 ± 11,0*(4)</b>
Urin <sub>Phosphat</sub> /Urin <sub>Krea</sub>	62,6 ± 9,8 (8)	40,7 ± 14,7 (5)	<sup>a</sup> 7,1 (1)
Osmolyte [mM]	2210 ± 186 (6)	2228 ± 217 (3)	<sup>b</sup>
<b>Fraktionelle Exkretionen</b>			
FE Natrium [%]	0,3 ± 0,12 (8)	0,3 ± 0,08 (4)	0,2 ± 0,03 (3)
FE Kalium [%]	25,3 ± 2,7 (8)	17,3 ± 5,2 (5)	21,9 ± 5,4 (5)
FE Chlorid [%]	0,5 ± 0,2 (8)	0,3 ± 0,1 (4)	0,8 ± 0,1 (5)
FE Kalzium [%]	<b>0,1 ± 0,01*(8)</b>	0,7 ± 0,20 (5)	<b>2,1 ± 0,34*(5)</b>
FE Magnesium [%]	<b>1,1 ± 0,2*(8)</b>	17,4 ± 1,7 (5)	<b>27,9 ± 3,5*(4)</b>
FE Phosphat [%]	23,9 ± 3,8 (8)	12,9 ± 4,0 (5)	<sup>a</sup> 2,15 (1)
FE Harnstoff [%]	42,3 ± 3,5 (8)	41,7 ± 5,5 (5)	33,7 ± 4,7 (5)

Eine ausführliche tabellarische Auflistung der metabolischen Daten der Magnesiumdiättiere findet sich in Tabelle 22.

#### *3.1.2.1 Auswirkungen der Niedrigmagnesiumdiät*

Die Niedrigmagnesiumdiättiere wiesen im Gegensatz zu den zugehörigen Kontrolldiätieren eine Hypomagnesiämie auf (0,53 mM; Kontrolldiättiere 0,96 mM (Tabelle 22)). Außerdem fiel eine Verminderung der Kalziumkonzentration im Plasma auf (2,30 mM; Kontrolldiättiere 2,37 mM (Tabelle 22)).

Neben der erniedrigten Ausscheidung von Magnesium war zusätzlich die renale Kalziumausscheidung der Niedrigmagnesiumdiättiere verringert, d. h. eine erhöhte renale Kalziumausscheidung erscheint als Ursache der verminderten Plasmakalziumkonzentration unwahrscheinlich. Die verringerte Kalzium- und Magnesiumausscheidung zeigte sich sowohl in den FEs (Tabelle 22) als auch in den auf die Kreatininkonzentration des Urins normalisierten Konzentrationen von Kalzium bzw. Magnesium im Urin.

#### *3.1.2.2 Auswirkungen der Hochmagnesiumdiät*

Die Hochmagnesiumdiät führte im Vergleich zur zugehörigen Kontrolldiät zu einer Hypermagnesiämie (2,20 mM; Kontrolldiättiere 0,96 mM (Tabelle 22)). Die Kalziumkonzentration im Plasma der Hochmagnesiumdiättiere war jedoch vermindert (2,12 mM; Kontrolldiättiere 2,37 mM (Tabelle 22)). Außerdem war die Kaliumkonzentration im Plasma der Hochmagnesiumdiättiere tendenziell erhöht (4,63 mM; Kontrolldiättiere 4,28 mM). Die Plasmakonzentration befand sich jedoch im Bereich einer Normokaliämie. Die Chloridkonzentration im Plasma war tendenziell erniedrigt (105,5 mM; Kontrolldiättiere 109 mM), obwohl die orale Chloridzufuhr im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert war.

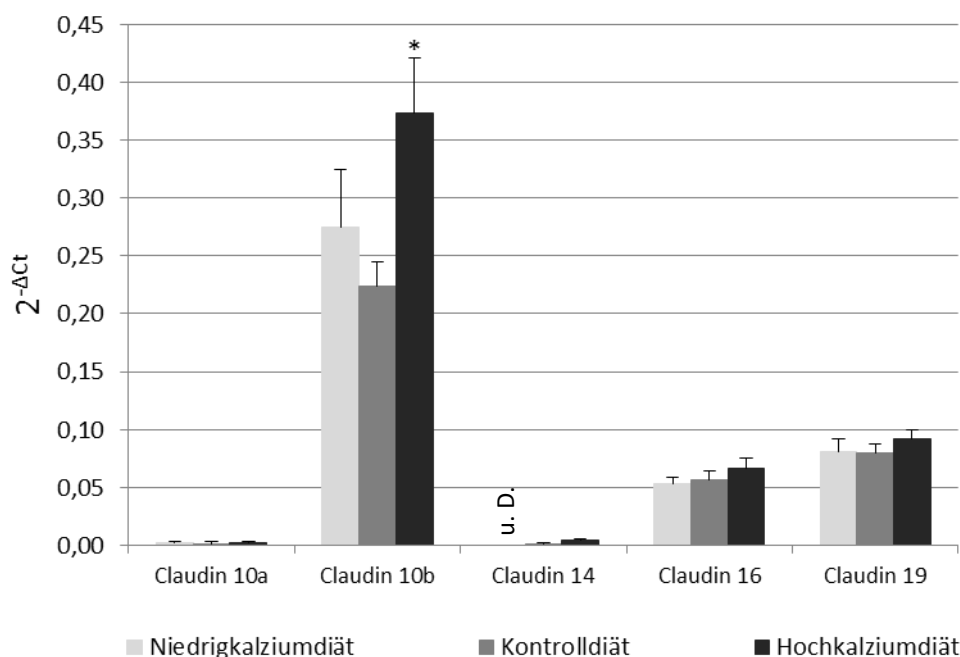
Die diätetische Belastung mit Magnesium führte zu einer gesteigerten renalen Magnesiumausscheidung (FE Magnesium 27,9 %; Kontrolldiättiere 17,4 % (Tabelle 22)). Gleichzeitig war auch die FE Kalzium erhöht (FE Kalzium 2,1 %; Kontrolldiättiere 0,69 % (Tabelle 22)), so dass hier der renale Kalziumverlust mit einer erniedrigten Plasmakalziumkonzentration einherging. Außerdem kam es zu einer verringerten Ausscheidung von Phosphat (Tabelle 22). Die FE Chlorid war unter der Hochmagnesiumdiät, die einen erhöhten Chloridanteil enthielt, tendenziell erhöht (0,75 %; Kontrolldiättiere 0,32 % (Tabelle 22)).

## 3.2 Claudin Expression in der TAL unter den verschiedenen diätetischen Bedingungen

### 3.2.1 Einfluss der oralen Kalziumaufnahme auf die Claudin mRNA Expression in der TAL

In der real time RT-PCR zeigte sich eine knapp oberhalb der Detektionsgrenze gelegene mRNA Expression von Claudin 10a, die sich zwischen den TAL der Kontrolldiättiere und der Niedrig- und Hochkalziumdiättiere nicht unterschied (Abbildung 16).

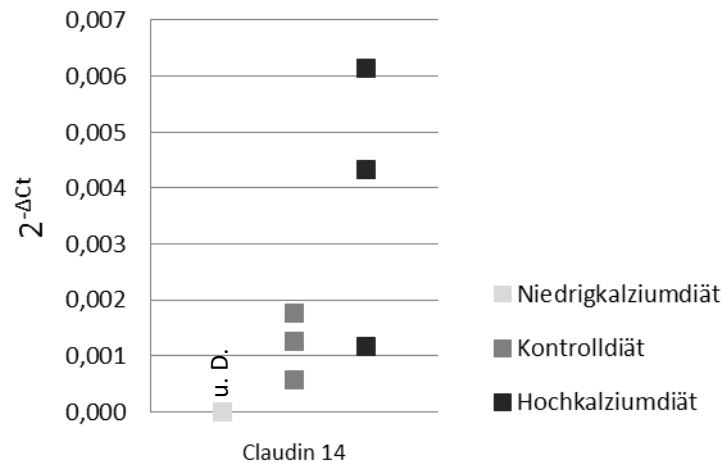
Unter sämtlichen diätetischen Bedingungen war Claudin 10b in der TAL von den untersuchten Claudinen das mit der höchsten mRNA Expression. In den TAL der Hochkalziumdiättiere zeigte sich eine im Vergleich zu den TAL der Kontrolldiättiere um den Faktor 1,5 ( $p = 0,017$ ) erhöhte mRNA Expression von Claudin 10b. Die TAL der Niedrigkalziumdiättiere zeigten eine in Bezug auf die TAL der Kontrolldiättiere unveränderte Claudin 10b mRNA Expression (Abbildung 16).



**Abbildung 16** mRNA Expression von Claudin 10a, 10b, 14, 16 und 19 in den TAL der Kontroll-, Niedrigkalzium- und Hochkalziumdiättiere. Die Daten sind als  $2^{-\Delta Ct}$  Werte dargestellt. u. D. = unter Detektionsgrenze. Die Anzahl der Tiere pro dargestellten Datenpunkt war von links nach rechts in der Abbildung für Claudin 10a  $n = 5$ ,  $n = 3$ ,  $n = 5$ , für Claudin 14  $n = 0$  (bei sechs untersuchten Proben),  $n = 3$ ,  $n = 3$ , für Claudin 10b, 16 und 19  $n = 6$  in allen Gruppen. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolldiät.

Claudin 14 mRNA war in den TAL aller Diätgruppen sehr niedrig exprimiert. In den TAL der Kontrolldiättiere lag die mRNA Expression knapp oberhalb der Detektionsgrenze, in den TAL der Niedrigkalziumdiättiere unterhalb der Detektionsgrenze. Die TAL der Hochkalziumdiät zeigten eine im Vergleich zur Expression der TAL der Kontrolldiät im Durchschnitt um den Faktor 3,3 tendenziell

erhöhte Claudin 14 mRNA Expression (Abbildung 16 und Abbildung 17, Kontrolldiät  $2^{-\Delta Ct} = 0,0012$ , Hochkalziumdiät  $2^{-\Delta Ct} = 0,0039$ ).



**Abbildung 17** mRNA Expression von Claudin 14 in den TAL der Kontroll-, Niedrig- und Hochkalziumdiättiere. Darstellung der Daten aus Abbildung 16 als einzelne Datenpunkte. u. D. = unter Detektionsgrenze.

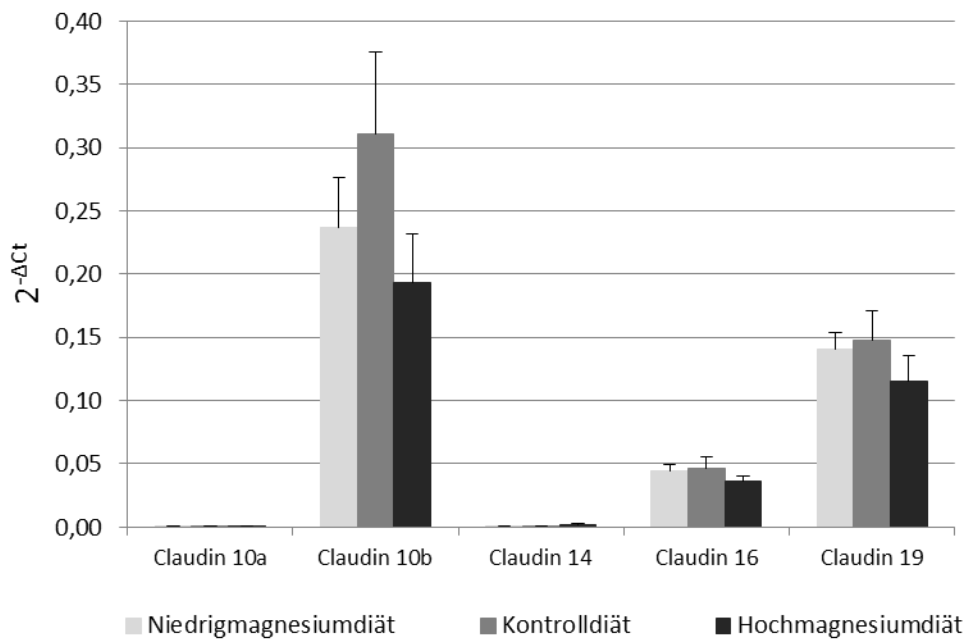
Die mRNA Expression von Claudin 16 und 19 war in den TAL messbar (Abbildung 16). Das mRNA Expressionsniveau lag jeweils deutlich unterhalb der mRNA Expression von Claudin 10b in der TAL. In den TAL der Kontrolldiättiere lag die mRNA Expression von Claudin 16 in etwa bei einem Viertel der mRNA Expression von Claudin 10b in TAL der Kontrolldiättiere, bei Claudin 19 bei in etwa 35 %. Zwischen den TAL der Kontrolldiättiere und der Niedrig- und Hochkalziumdiättiere zeigte sich eine unveränderte Claudin 16 und 19 mRNA Expression.

### 3.2.2 Einfluss der oralen Magnesiumaufnahme auf die Claudin mRNA Expression in der TAL

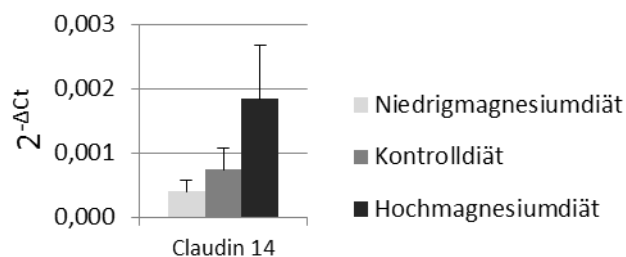
Die Claudin 10a Expression lag auch in den TAL der Kontroll-, Niedrig- und Hochmagnesiumdiättiere nur knapp oberhalb der Detektionsgrenze (Abbildung 18).

Die mRNA Expression von Claudin 10b war in den Nieren unter Niedrig- und Hochmagnesiumdiät in Bezug auf die mRNA Expression in den TAL der Kontrolldiättiere unverändert (Abbildung 18).

In den TAL aller Diätgruppen war Claudin 14 mRNA sehr niedrig exprimiert, jedoch messbar. Im Vergleich zur Kontrolldiät war die Claudin 14 mRNA Expression in den TAL der Hochmagnesiumdiät tendenziell um den Faktor 2,6 erhöht (Abbildung 18 und Abbildung 19, Niedrigmagnesiumdiät  $2^{-\Delta Ct} = 0,0004$ , Kontrolldiät  $2^{-\Delta Ct} = 0,0007$ , Hochmagnesiumdiät  $2^{-\Delta Ct} = 0,0018$ ).



**Abbildung 18** mRNA Expression von Claudin 10a, 10b, 14, 16 und 19 in den TAL der Kontroll-, Niedrigmagnesium- und Hochmagnesiumdiättiere. Die Daten sind als  $2^{-\Delta Ct}$  Werte dargestellt. Die Anzahl der Tiere pro dargestellten Datenpunkt ist von links nach rechts in der Abbildung für Claudin 10a n = 7, n = 5, n = 3, für Claudin 14 n = 6, n = 5, n = 8, für Claudin 10b, 16 und 19 n = 8 für alle Diätgruppen. \* p < 0,05 vs. Kontrolldiät.

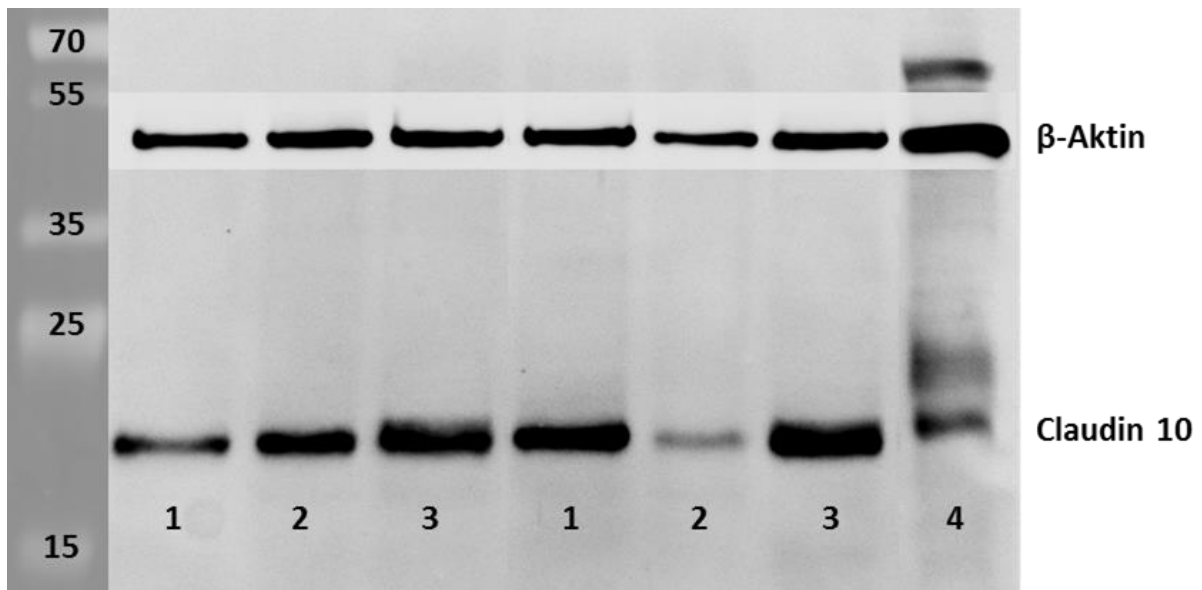


**Abbildung 19** mRNA Expression von Claudin 14 wie in Abbildung 18 dargestellt mit veränderter Einteilung der Ordinate. \* p < 0,05 vs. Kontrolldiät.

Das mRNA Expressionsniveau von Claudin 16 und 19 lag auch hier jeweils deutlich unterhalb der mRNA Expression von Claudin 10b in der TAL. In den TAL der Kontrolldiättiere lag die mRNA Expression von Claudin 16 in etwa bei 15 % der mRNA Expression von Claudin 10b in TAL der Kontrolldiättiere, bei Claudin 19 bei in etwa 47 %. Zwischen den TAL der Kontrolldiättiere und der Niedrig- und Hochmagnesiumdiättiere zeigte sich eine unveränderte Claudin 16 und 19 mRNA Expression.

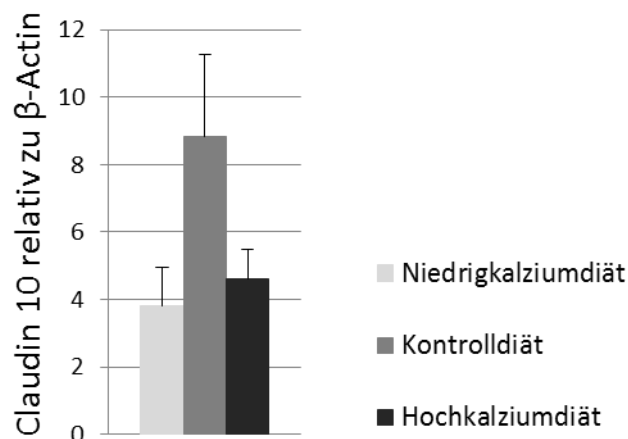


### 3.3 Claudin 10 Western Blots aus TAL von Kalziumdiättieren



**Abbildung 20** Western Blot, Claudin 10 gefärbt. Die obere Bande (ca. 42 kDa) zeigt das als Referenzprotein eingesetzte  $\beta$ -Aktin, die untere Bande Claudin 10 (ca. 20 kDa). Die Proteingröße in kDa wird in der linken Spur angezeigt. Die TAL der mit 1 gekennzeichneten Spuren stammen von Kontrolldiätmäusen, die mit 2 gekennzeichneten von Niedrigkalziumdiätmäusen und die mit 3 gekennzeichneten von Hochkalziumdiätmäusen. Für Spur 4 wurden 20  $\mu$ g Gesamtnierenprotein eingesetzt.

Abbildung 20 zeigt einen repräsentativen WB von TAL der verschiedenen Kalziumdiättiere. In der semiquantitativen Auswertung aller angefertigten WBs (Abbildung 21) zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Claudin 10 Proteinexpression in den untersuchten TAL.

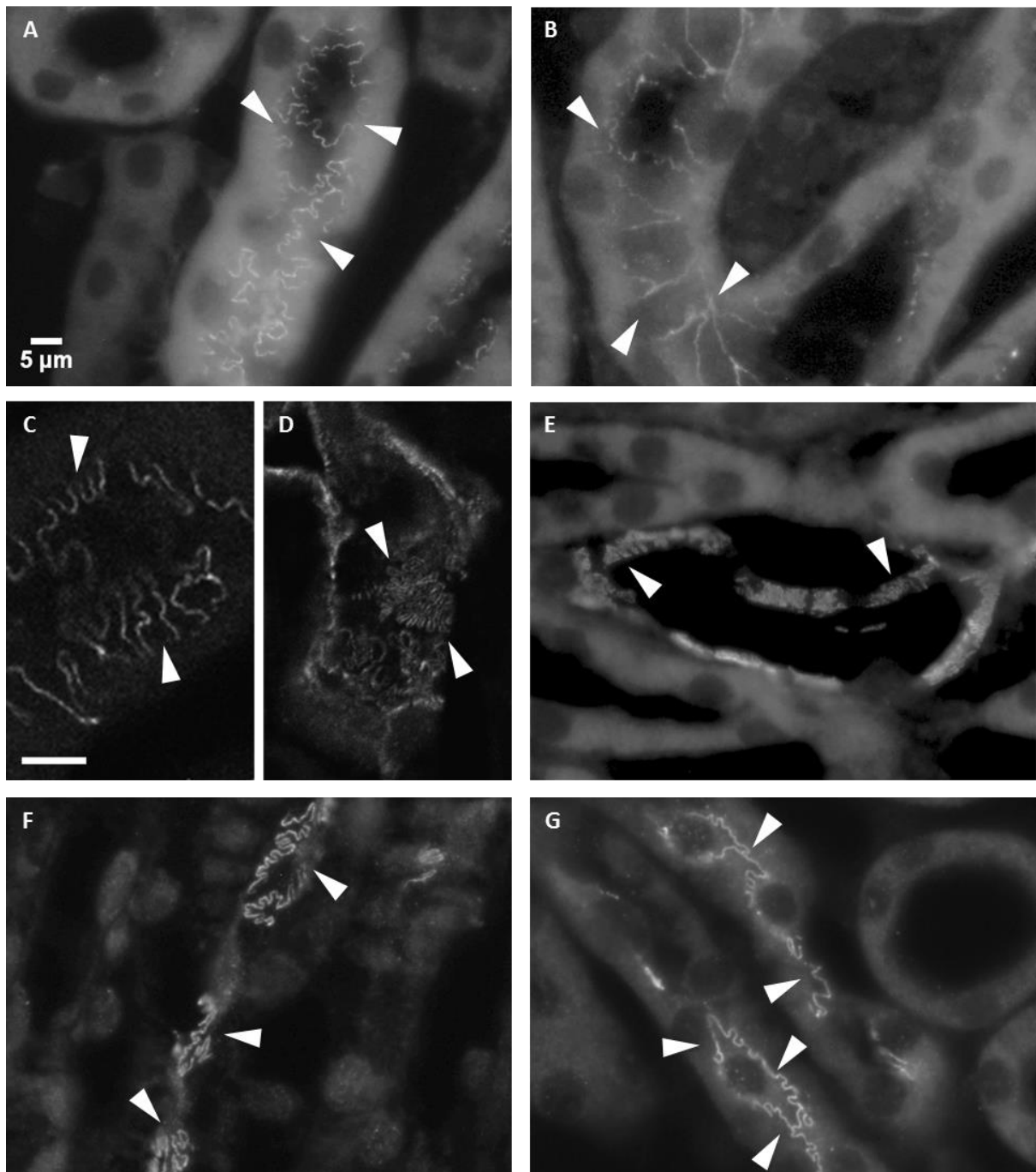


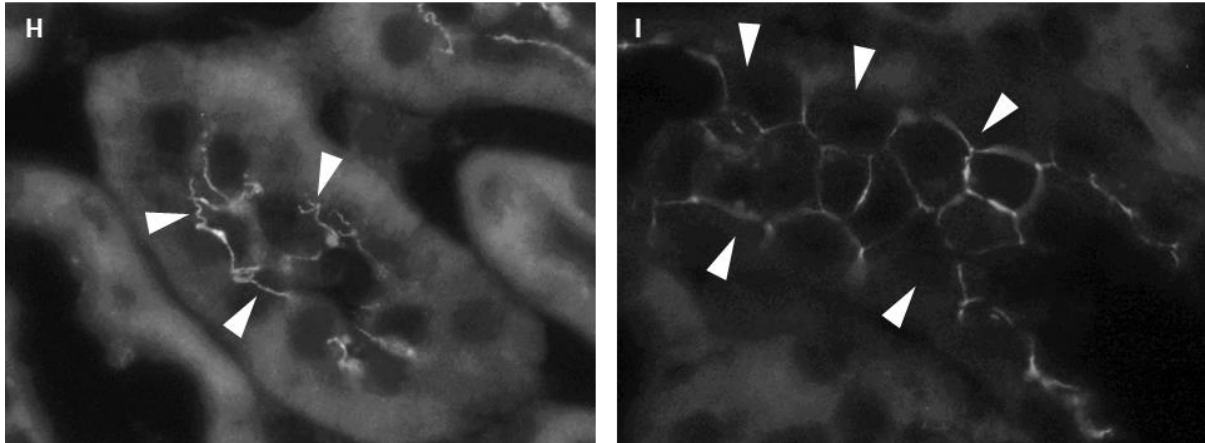
**Abbildung 21** Proteinexpression von Claudin 10 in den TAL der Kontroll-, Niedrig- und Hochkalziumdiättiere. Die Daten sind auf 20  $\mu$ g Gesamtnierenprobe normalisiert und relativ zum Referenzprotein  $\beta$ -Aktin angegeben (siehe auch Methodenkapitel 2.6.4). Die Anzahl der Tiere pro dargestellten Datenpunkt ist für die Datenpunkte von den TAL der Kontroll- und Niedrigkalziumdiättiere n = 6, für die Hochkalziumdiättiere n = 5.

### 3.4 Lokalisation der Claudine entlang des Nephrons

#### 3.4.1 Muster der TJ entlang des Nephrons

Zu Beginn dieses Abschnitts soll zunächst dem Umstand Rechnung getragen werden, dass sich das Muster der TJ entlang des Nephrons bereits lichtmikroskopisch sichtbar ändert, unabhängig von der Claudinzusammensetzung. Innerhalb eines Nephronabschnitts bleibt das TJ Muster jedoch konstant. Abbildung 22 zeigt exemplarisch das Muster in den verschiedenen Nephronabschnitten.





**Abbildung 22** TJ Muster entlang des Nephrons. Der in Abbildung A gezeigte Größenbalken gilt ebenso für Abbildung B sowie E bis I. Der in Abbildung C gezeigte Größenbalken entspricht 5  $\mu\text{m}$  und gilt ebenso für Abbildung D. Die Pfeilspitzen weisen auf die jeweils zu beachtenden Muster hin. **A** Occludin gefärbter kortikaler PT **B** Claudin 2 gefärbter medullärer PT **C** Claudin 2 gefärbter PT **D** Claudin 2 gefärbte dTL **E** Claudin 2 gefärbte dTL im ISOM **F** Claudin 16 gefärbte TL in der IM **G** Claudin 16 gefärbte TAL des OSOM **H** Occludin gefärbter DCT **I** Occludin gefärbter kortikaler CD.

Zu Beginn des proximalen Tubulus zeigten sich die TJ als feine Linien mit Mäander-artigem Aussehen (Abbildung 22 A und C). Das starke Mäandrieren der TJ im frühen PT wurde über den Verlauf des PT stets schwächer. Dabei zeigten sich die TJ weiterhin als feine Linien. Gegen Ende des PT lag ein meist annähernd gerades, teilweise leicht kurvigtes Muster der TJ vor. Abbildung 22 B zeigt beispielhaft einen medullären PT.

Die TJ der dTL und aTL zeigten unterschiedliche Muster. In der dTL im ISOM war die TJ als sehr krauses Muster sichtbar (Abbildung 22 D und E). Abbildung 22 C zeigt zum Vergleich das mäandrierende TJ Muster des PT im selben Maßstab, wie Abbildung 22 D das krause TJ Muster der dTL des ISOMs. Im Gegensatz zum ausschließlich krausen TJ Muster des ISOM zeigten die TJ der TL in der IM sowohl krause als auch stark mäandrierende Muster, die jedoch etwas eckiger erschienen als im PT (Abbildung 22 F).

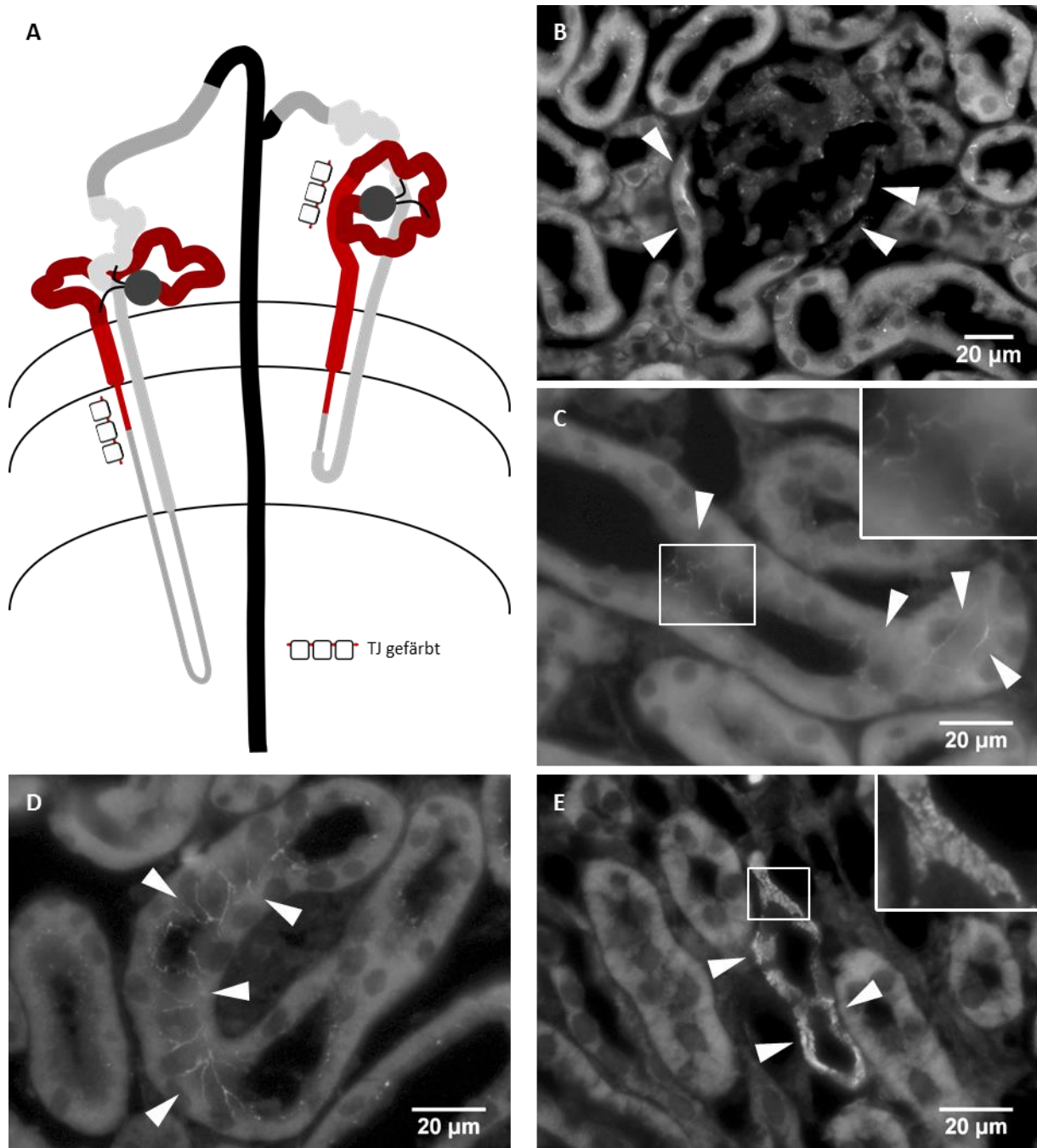
Das Mäander-artige Muster der TJ der TAL zeigte sich nahezu identisch in allen kortikomedullären Abschnitten der Niere, wobei die Ausprägung der Interdigitationen der TJ der TAL im ISOM eher etwas schwächer ausgeprägt waren als im OSOM und Kortex. Die Ähnlichkeit der TJ Muster von aTL und TAL des OSOM bzw. Kortex zeigt sich im Vergleich von Abbildung 22 F und G.

Der DCT (Abbildung 22 H) zeigte ein geraderes, zum Teil leicht gewundenes TJ Muster.

Der CD zeigte eine geradlinige TJ, die wie in Abbildung 22 I gezeigt, kopfsteinpflasterartig erschien.

### 3.4.2 Vorkommen und Verteilung verschiedener Claudine in der murinen Niere

#### 3.4.2.1 Claudin 2



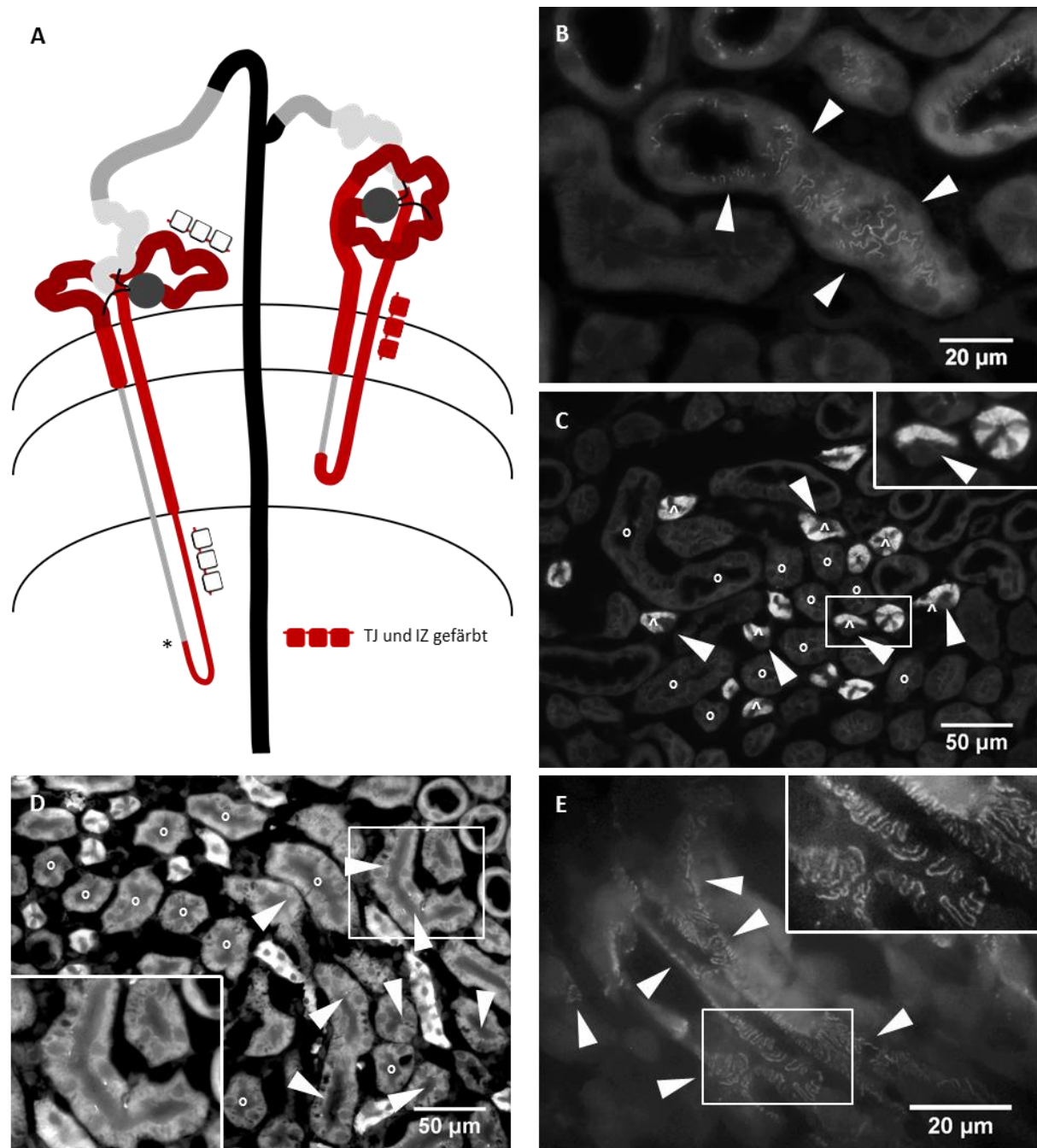
**Abbildung 23** Verteilung von Claudin 2 **A** Schema der Claudin 2 Verteilung in der murinen Niere. Die weißen Kästen in den Abbildungen markieren jeweils den Bereich, der nochmals vergrößert gezeigt wird. **B** Claudin 2 am Beginn des PT und im Bereich der Bowman Kapsel **C** kortikaler Claudin 2 gefärbter PT **D** medullärer Claudin 2 gefärbter PT **E** Claudin 2 gefärbte TL aus dem äußeren Bereich des ISOM.

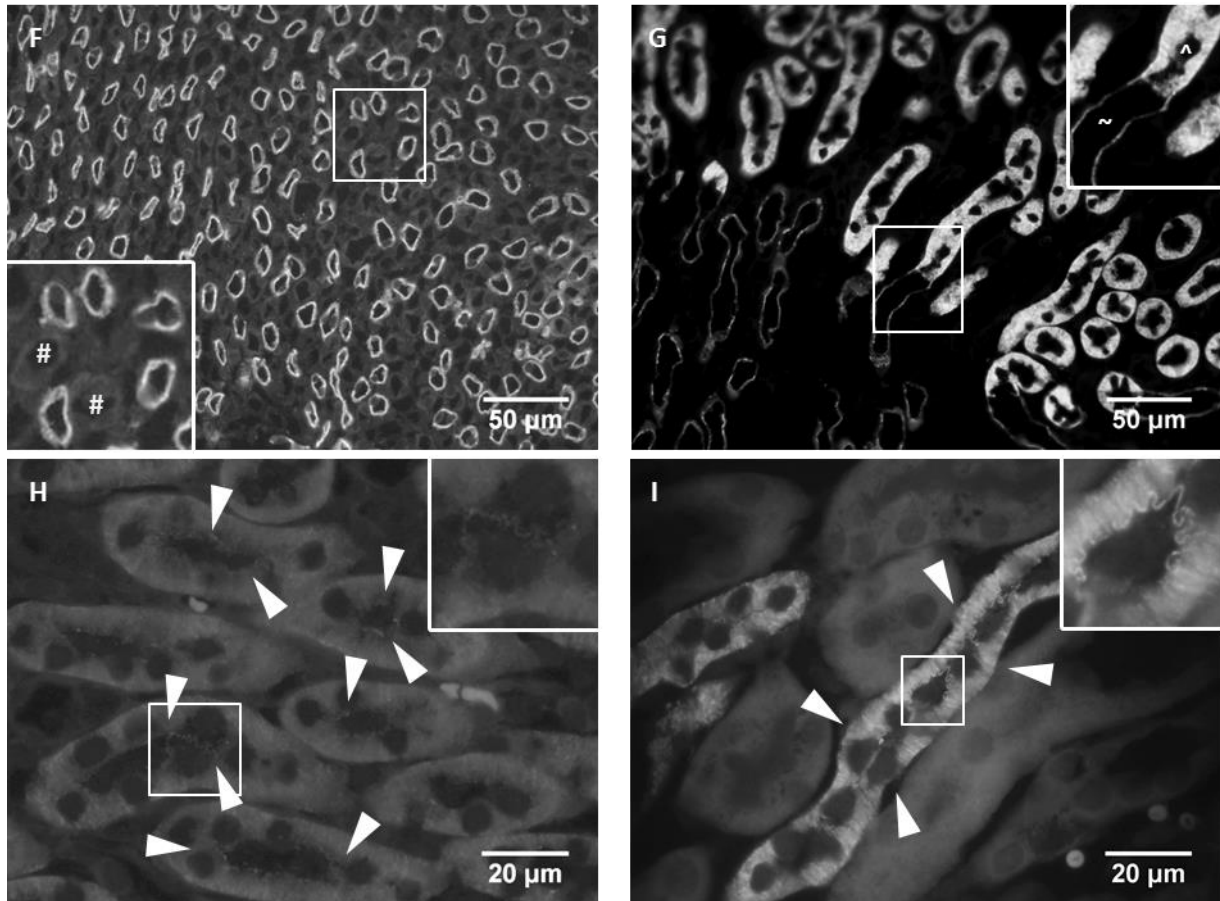
Claudin 2 gefärbte TJ fanden sich wie in Abbildung 23 A gezeigt im gesamten PT. Teile der Bowman Kapsel und der das Glomerulum kelchartig umschließende PT waren Claudin 2 gefärbt. Im PT nahm die Menge des in der TJ lokalisierten Claudin 2 dabei vom kortikalen zum medullären PT zu

(Abbildung 23 C und D). Auch der erste Anteil der dTL zeigte an den PT anschließend ein deutliches, stark gefälteltes, Claudin 2 gefärbtes TJ Muster. Eine zytosolische Claudin 2 Färbung war in keinem Nephronabschnitt zu finden.

### 3.4.2.2 Claudin 10

Die Claudin 10 Färbung der murinen Niere zeigte eine Färbung der TJ in PT, TL, TAL, sowie eine verschieden starke intrazelluläre Färbung in PT und TAL. In DCT und CD war weder eine TJ noch eine intrazelluläre Färbung zu finden (Abbildung 24 A).





**Abbildung 24** Verteilung von Claudin 10 **A** Schema der Claudin 10 Verteilung in der murinen Niere. \* ab wann bzw. ob Claudin 10 in der dTL der IM in der TJ vorkommt kann nicht sicher belegt werden (weitere Erklärungen siehe Text). Die weißen Kästen in den Abbildungen markieren jeweils den Bereich, der nochmals vergrößert gezeigt wird. ° = PT, ~ =TL, ^ = TAL, # = CD. **B** kortikaler Claudin 10 gefärbter, längsgetroffener PT **C** kortikale Übersichtsaufnahme mit Claudin 10 gefärbten TJ im PT (°) sowie intrazellulärer Claudin 10 Färbung (weiße Pfeilspitzen weisen auf TAL Zellen ohne intrazelluläre Claudin 10 Färbung hin) und Claudin 10 gefärbten TJ in der TAL (^) **D** Übersichtsaufnahme des OSOM mit Claudin 10 gefärbten TJ im PT (°; mit weißen Pfeilspitzen markiert) **E** längsgetroffene Claudin 10 gefärbte TL im weit medullären Teil der IM **F** Claudin 10 gefärbter Querschnitt der IM, # kennzeichnet die in der Vergrößerung angeschnittenen CD. In den CD ist keine TJ Färbung zu erkennen. **G** Übergang junctional Claudin 10 gefärbter aTL (~) in der IM in Claudin 10 gefärbte TAL (^) im ISOM **H** Claudin 10 gefärbte TAL aus dem ISOM mit mäßig starker intrazellulärer Färbung und schwach sichtbaren, reichlich vorhandenen Claudin 10 gefärbten TJ **I** kortikale Claudin 10 gefärbte TAL mit starker intrazellulärer Färbung und reichlich vorhandenen, gut sichtbaren Claudin 10 gefärbten TJ. cTAL Färbung gleicht der in TAL des OSOM.

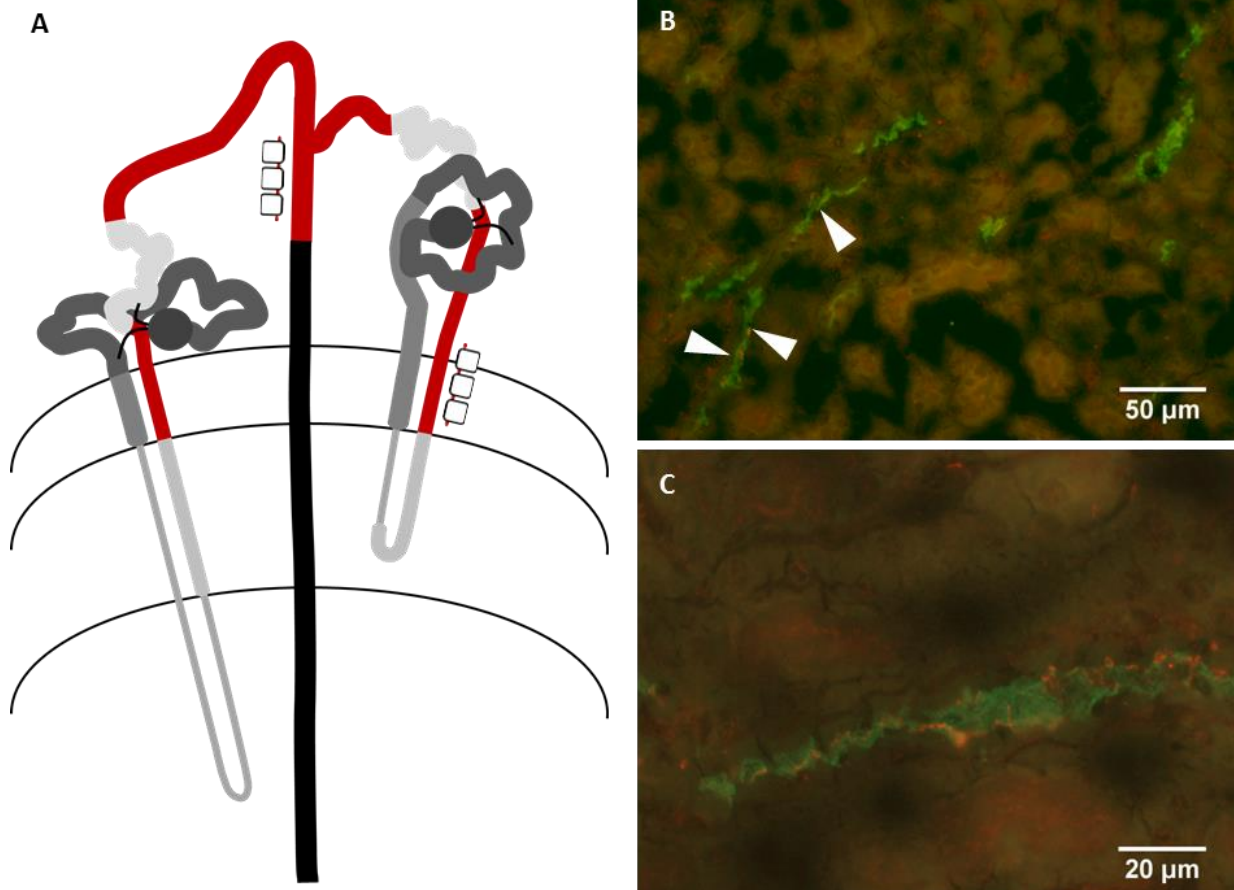
Die PT zeigten intrazellulär sowohl kortikal als auch medullär eine sehr schwache Färbung. Die Färbung der TJ des PT war kortikal reichlich vorhanden, dabei erschienen die einzelnen TJ sehr zart (Abbildung 24 B). Nach medullär nahm die TJ Färbung im PT ab. Im OSOM waren entsprechend nur vereinzelt TJ des PT Claudin 10 gefärbt (weiße Pfeilspitzen in Abbildung 24 D und mit ° gekennzeichnete, im Anschnitt nicht junctional gefärbte PT).

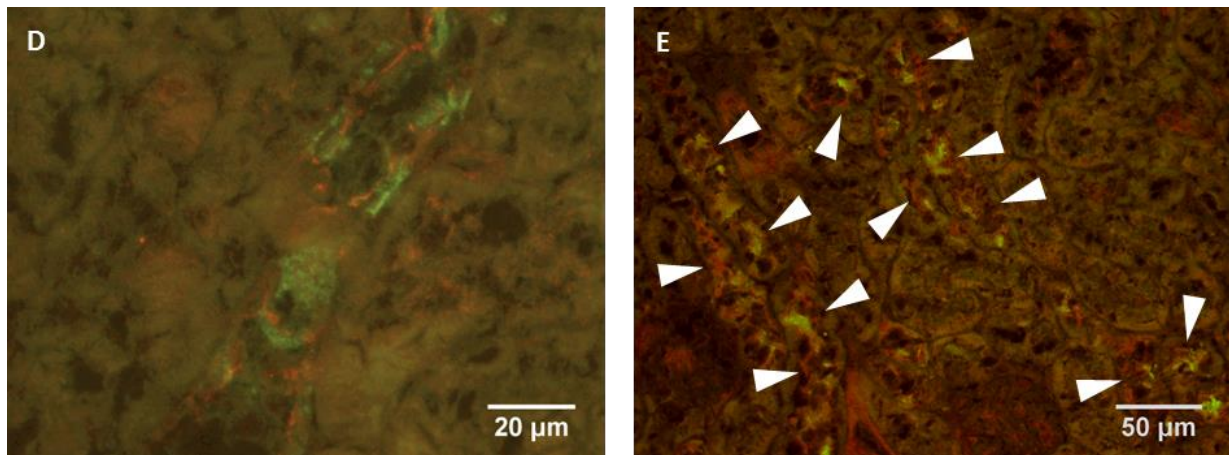
Eine Claudin 10 Färbung der TJ der TL fand sich in sehr vielen TL der IM (Abbildung 24 E und F). Außerdem wurde Claudin 10 in TJ von aTL (~) im Übergang zu TAL (^) gefunden (Abbildung 24 G). Das Muster der Claudin 10 gefärbten TJ der IM war dabei einheitlich und glich dem in Abbildung 22 F gezeigten. Vom Scheitelpunkt der TL konnte die junctionale Färbung in beide Richtungen (dTL und

aTL) über kurze Abschnitte verfolgt werden. Ein Vorkommen von Claudin 10 in den TJ der weiter in Richtung Kortex gelegenen dTL der IM konnte weder bestätigt noch sicher ausgeschlossen werden. Die TAL des ISOM zeigte eine mäßig starke, einheitliche intrazelluläre Claudin 10 Färbung. Die TJ waren in diesem Bereich der TAL reichlich vorhanden und erschienen sehr zart (Abbildung 24 H). Im Gegensatz dazu war die intrazelluläre Färbung der TAL in OSOM intensiv, sowie im Kortex intensiv bis sehr intensiv. Insbesondere die kortikale intrazelluläre Färbung, weniger die im OSOM, zeigte eine Struktur auf die in Kapitel 3.4.2.6 näher eingegangen wird. In Kortex und OSOM zeigten sich außerdem Zellen ohne intrazelluläre Claudin 10 Färbung in der TAL (weiße Pfeilspitzen in Abbildung 24 C). Die Claudin 10 gefärbten TJ der in Kortex und OSOM lokalisierten TAL waren wie im ISOM reichlich vorhanden, jedoch war die gefärbte TJ selbst deutlicher sichtbar (Abbildung 24 I).

### 3.4.2.3 Claudin 14

Eine Unterscheidung von Kortex und OSOM in der unfixierten Niere war nicht möglich, weshalb in diesem Kapitel der Ausdruck Kortex/OSOM verwendet wird. Claudin 14 gefärbte TJ wurden in TAL und CD des äußeren Bereichs des Kortex gefunden. In PT, TL und DCT konnte keine Claudin 14 TJ Färbung gefunden werden. Eine eventuell vorhandene intrazelluläre Färbung konnte wegen der Anwendung des Claudin 14 Antikörpers in unfixierten Nieren grundsätzlich nicht beurteilt werden.





**Abbildung 25** Verteilung von Claudin 14 **A** Schema der Claudin 14 Verteilung in der murinen Niere **B und C** Claudin 14 (rot) und NKCC2 (grün) Färbung **B** Übersicht über Kortex/OSOM, weiße Pfeilspitzen weisen auf in der TJ der TAL lokalisiertes Claudin 14 hin **C** TAL mit in der TJ lokalisiertes Claudin 14 **D und E** Claudin 14 (rot) und B1-V-ATPase (grün) Färbung **D** CD mit *einigem* in der TJ lokalisiertes Claudin 14 **E** Übersicht aus Kortex mit zahlreichen CD mit Claudin 14 gefärbten TJ.

In 20 bis 30 % der TAL, die durch die Kofärbung mit NKCC2 identifiziert wurden, fanden sich Claudin 14 gefärbte TJ. In den meisten Fällen fanden sich nur kaum (Abbildung 25 B) oder einige Claudin 14 gefärbte TJ. In einigen TAL waren jedoch auch mehr TJ Claudin 14 gefärbt (Abbildung 25 C). TAL mit vermehrt Claudin 14 in der TJ traten meist regional gehäuft auf.

In 80 bis 90 % der CD der äußeren Bereiche des Kortex wurde eine, in der TJ lokalisierte, Claudin 14 Färbung gefunden. Diese war wie in Abbildung 25 oder in wenigen Fällen geringer ausgeprägt. Abbildung 25 E zeigt eine Übersicht von CD mit Claudin 14 gefärbten TJ aus dem Kortex (Markierung mit weißen Pfeilspitzen).

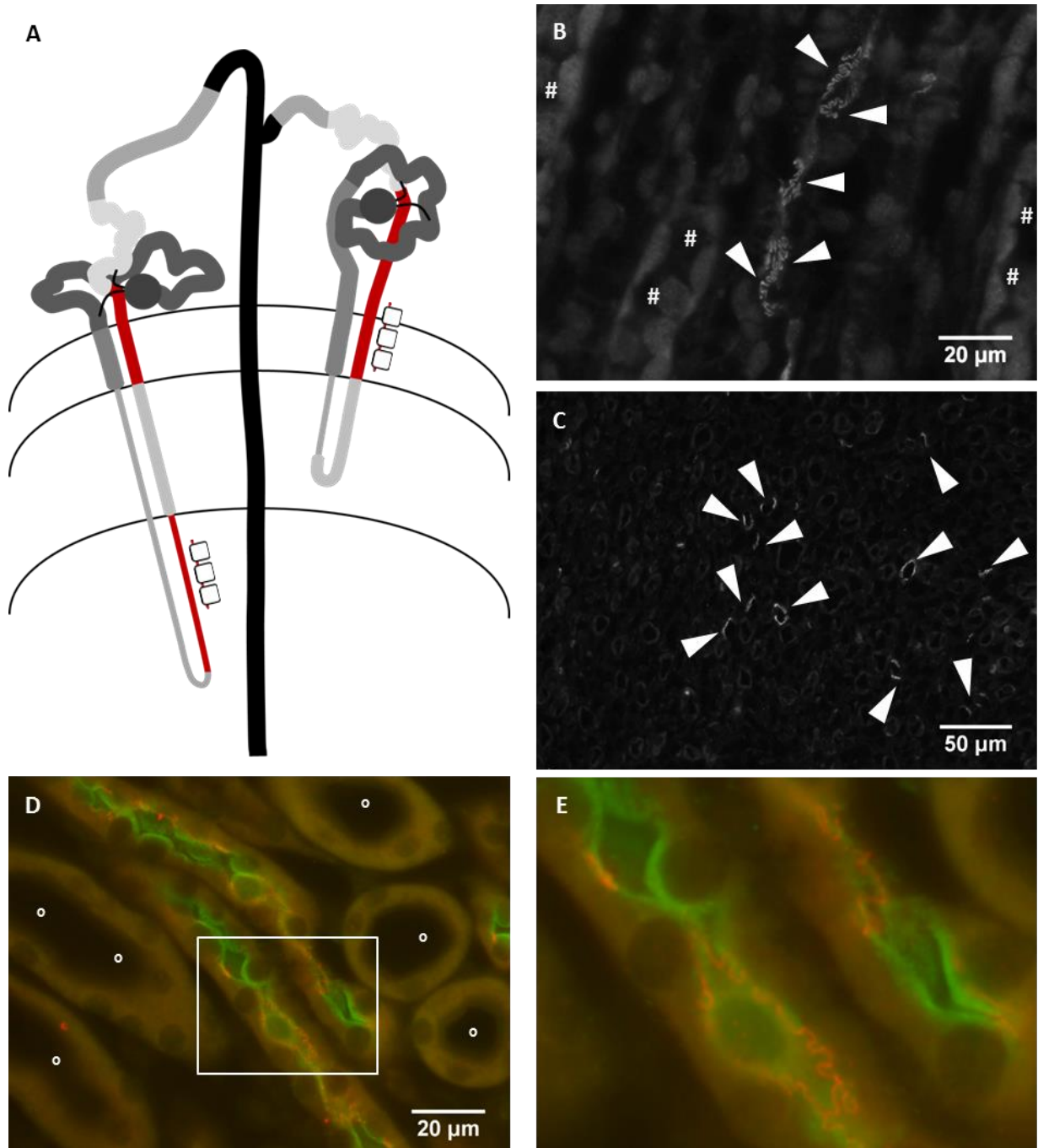
#### 3.4.2.4 Claudin 16

Die Claudin 16 Färbung der murinen Niere zeigte eine Färbung der TJ in TL und TAL. Eine intrazelluläre Färbung trat in der gesamten Niere nicht auf (Abbildung 26 A).

Eine Claudin 16 Färbung der TJ der TL fand sich ausschließlich in wenigen TL der IM. Das Muster der Claudin 16 gefärbten TJ der IM war dabei einheitlich und glich dem in Abbildung 26 B gezeigten. Vermutlich handelte es sich bei den Claudin 16 gefärbten TJ der TL ausschließlich um aTL. Der in Abbildung 26 C gezeigte Querschnitt der IM verdeutlicht die, im Gegensatz zu Claudin 10, geringe Menge von Claudin 16, welche in TJ der TL der IM vorkommt. Abbildung 26 C und Abbildung 24 F zeigen zum Vergleich den identischen Ausschnitt der IM.

Hauptsächlich war Claudin 16 in OSOM und Kortex in TJ der TAL zu finden. TAL in Kortex und OSOM unterschieden sich im Aussehen nicht (Abbildung 26 D). Es traten in nahezu allen TAL reichlich Claudin 16 gefärbte TJ auf.

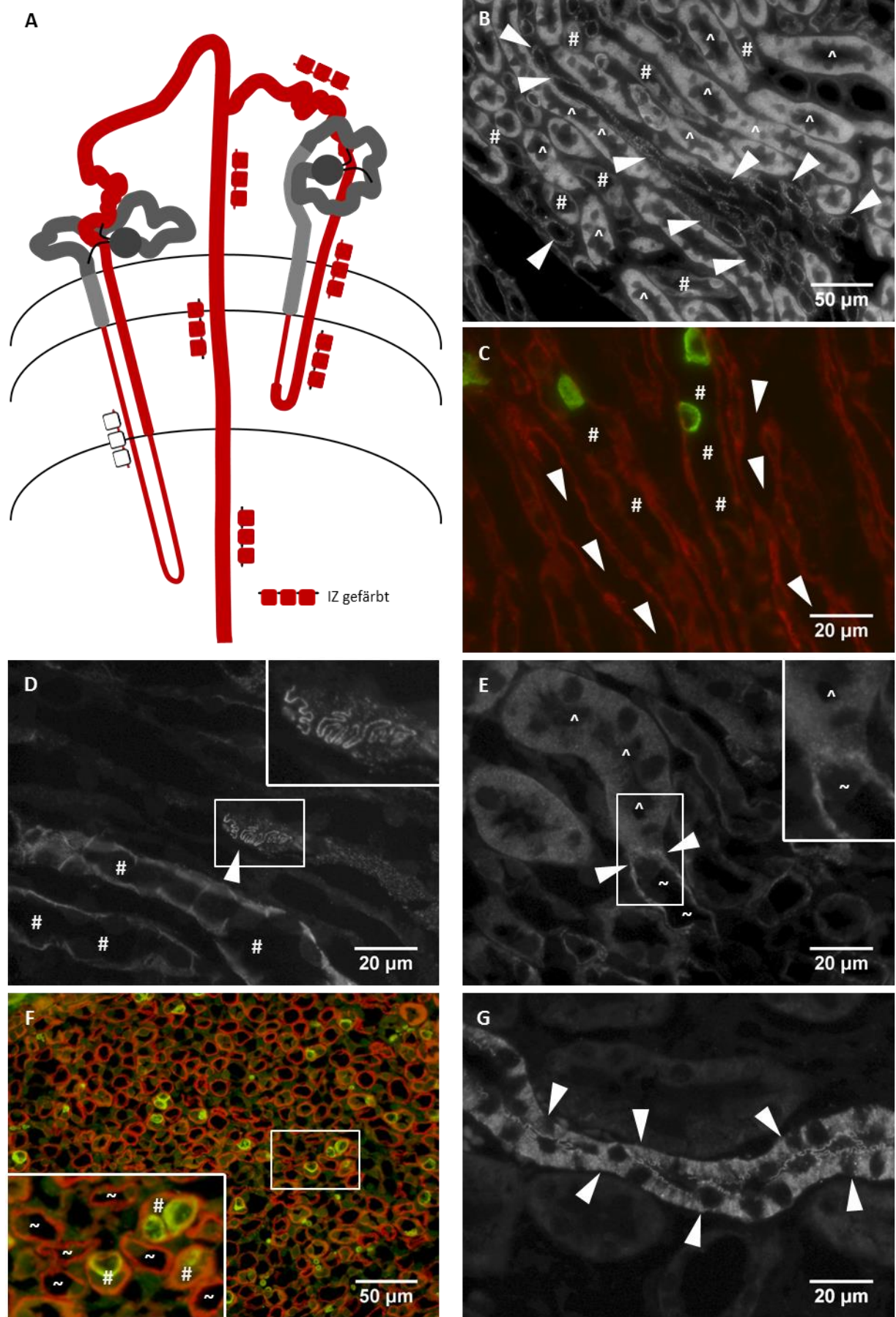


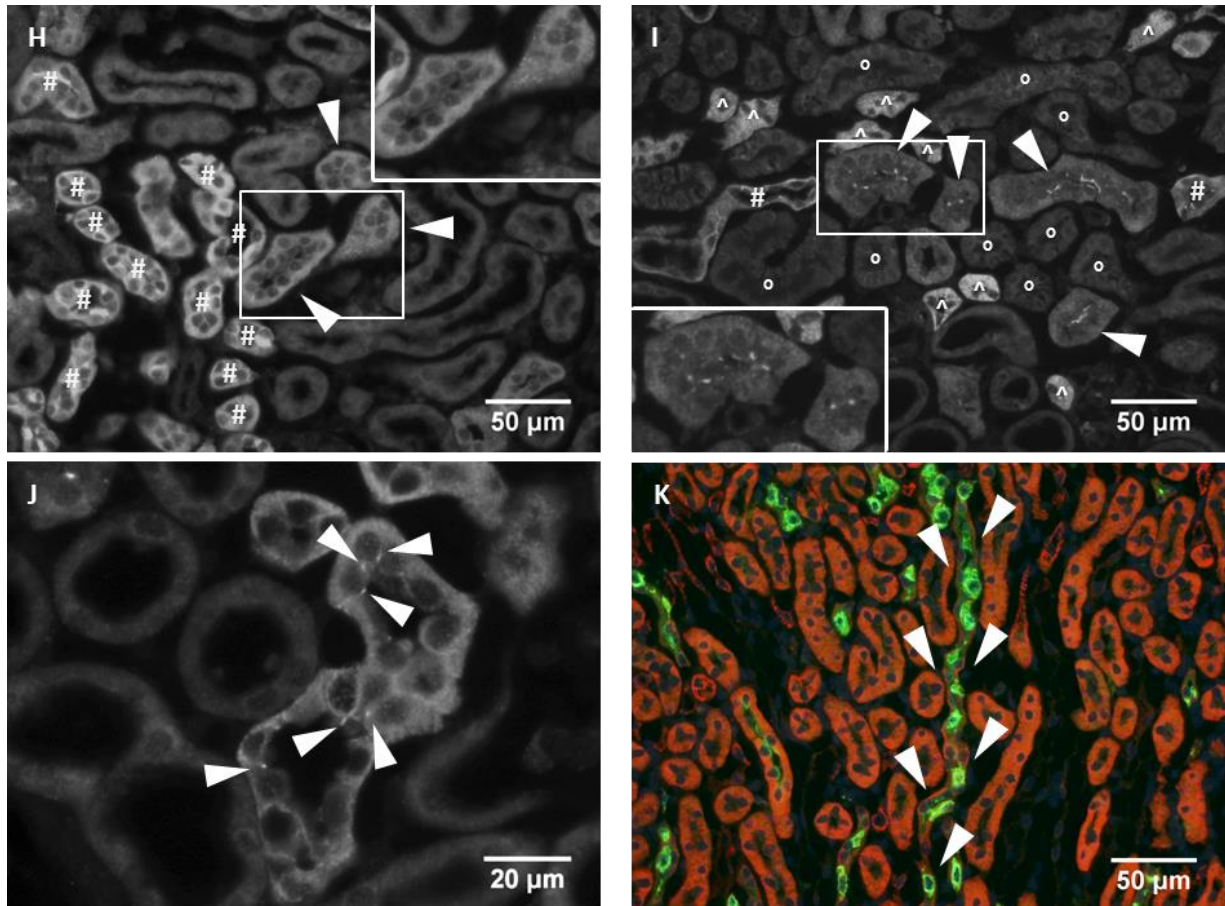


**Abbildung 26** Verteilung von Claudin 16 **A** Schema der Claudin 16 Verteilung in der murinen Niere. Die weißen Kästen in den Abbildungen markieren jeweils den Bereich, der nochmals vergrößert gezeigt wird. ° = PT, # = CD. **B** In der TJ einer TL der IM lokalisiertes Claudin 16. # markieren angeschnittene CD. **C** Claudin 16 gefärbter Querschnitt der IM. Abbildung 24 F zeigt denselben Ausschnitt der IM mit Claudin 10 Färbung. Weiße Pfeilspitzen weisen auf Claudin 16 gefärbte TJ der TL. **D** TAL im OSOM mit in der TJ befindlichen Claudin 16 (rot). Kofärbung mit NKCC2 (grün). TJ Färbung gleicht der in TAL des Kortex. ° markieren angeschnittene PT. **E** zeigt den in D mit weißem Kasten markierten Bereich als Detailansicht.

### 3.4.2.5 Claudin 19

Die Claudin 19 Färbung der murinen Niere zeigte eine Färbung der TJ in TL, TAL, DCT und CD sowie eine verschieden stark ausgeprägte intrazelluläre Färbung in TAL, DCT und CD. Im PT war weder eine TJ noch eine intrazelluläre Färbung zu finden (Abbildung 27 A).





**Abbildung 27** Verteilung von Claudin 19 **A** Schema der Claudin 19 Verteilung in der murinen Niere. Die weißen Kästen in den Abbildungen markieren jeweils den Bereich, der nochmals vergrößert gezeigt wird. ° = PT, ~ = TL, ^ = TAL, # = CD. **B** Claudin 19 gefärbte TJ in TL im ISOM. Weiße Pfeilspitzen weisen auf die gefärbten TJ. ^ markieren TAL, # angeschnittene CD. **C** TL und CD im IM. Claudin 19 (rot) und B1-V-ATPase (grün). Weiße Pfeilspitzen markieren das Lumen von TL, # das Lumen von CD. In den TL sind gefärbte TJ sichtbar. Die CD zeigen eine intrazelluläre Claudin 19 Färbung. **D** Claudin 19 gefärbte TJ einer TL in der IM. Dieses Muster der TJ kommt in der Claudin 19 Färbung sehr selten vor. # markieren angeschnittene CD. **E** Übergang einer Claudin 19 gefärbten aTL (~) in eine TAL (^). **F** Claudin 19 (rot) und B1-V-ATPase (grün) gefärbter Querschnitt der IM. In der Detailansicht sind die angeschnittenen CD mit #, die TL mit ~ gekennzeichnet. **G** korticale Claudin 19 gefärbte TAL (mit weißen Pfeilspitzen markiert) mit starker intrazellulärer Färbung und kräftig gefärbten TJ. TJ Färbung gleicht der in TAL des OSOM. **H** Ausschnitt aus dem Kortex einer Claudin 19 gefärbten Niere. Weiße Pfeilspitzen zeigen auf DCT mit kaum TJ Färbung. **I** Ausschnitt aus Kortex einer Claudin 19 gefärbten Niere. Weiße Pfeilspitzen zeigen auf DCT mit einiger TJ Färbung. ° markieren PT, ^ TAL und # CD. **J** Kortaler CD. Intrazelluläre Färbung mäßig stark ausgeprägt, kaum TJ Claudin 19 gefärbt (weiße Pfeilspitzen). **K** Claudin 19 (rot) gefärbter CD (weiße Pfeilspitzen) im ISOM und Kofärbung der B1-V-ATPase (grün) mit etwas schwächer ausgeprägter intrazellulärer Färbung als kortal sowie keiner Färbung der TJ.

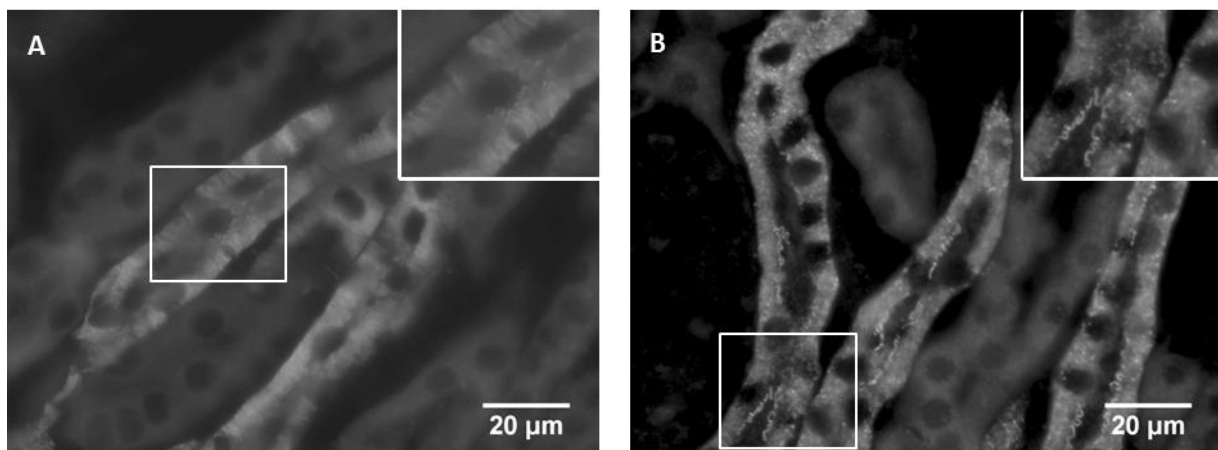
Eine Claudin 19 Färbung der TJ der TL fand sich im ISOM (Abbildung 27 B, weiße Pfeilspitzen) und in vielen TJ der IM (Abbildung 27 C und D). Am Übergang von ISOM zu IM konnten sowohl in dTL als auch in aTL Claudin 19 gefärbte TJ gefunden werden. Abbildung 27 E zeigt den Übergang einer Claudin 19 gefärbten TJ von aTL zu TAL. Am Übergang von dTL zu aTL wurde kaum Claudin 19 in den TJ gefunden. Die meisten TJ der TL in der IM zeigten das aus dem ISOM bekannte Muster, nur in sehr seltenen Fällen wurde das in Abbildung 27 D gezeigte Muster gefunden. Abbildung 27 F zeigt einen Querschnitt der IM. Es sind sowohl TL mit gefärbten TJ als auch intrazellulär gefärbte CD zu sehen.

Die TAL des ISOM zeigte sich ohne Claudin 19 gefärbte TJ mit starker intrazellulärer Färbung. In OSOM und Kortex zeigte sich die TAL mit reichlich Claudin 19 gefärbten TJ sowie starker intrazellulärer Claudin 19 Färbung (Abbildung 27 G). Die kortikale intrazelluläre Färbung zeigte eine Struktur, auf die in Kapitel 3.4.2.6 näher eingegangen wird. Regional traten im OSOM gehäuft TAL ohne Claudin 19 gefärbte TJ auf.

Im DCT traten Claudin 19 gefärbte TJ auf, dabei war kein vollständiges Claudin 19 gefärbtes TJ Netz sichtbar, sodass Claudin 19 gefärbte TJ strichförmig erschienen. Die Menge der Claudin 19 gefärbten TJ im DCT variierte zwischen *kaum* (Abbildung 27 H, mit der Kamera nicht dokumentierbar, nur punktuell) und *einige* (Abbildung 27 I, linienförmig). Im DCT war intrazellulär eine schwache Claudin 19 Färbung sichtbar.

Auch die TJ Färbung im CD zeigte kein vollständiges Claudin 19 gefärbtes TJ Netz. Im Kortex, sowie in wenigen Fällen im OSOM, konnte punktuell Claudin 19 in der TJ gefunden werden (Abbildung 27 J). Im gesamten medullären CD war intrazellulär eine mäßig starke Claudin 19 Färbung vorhanden (Abbildung 27 K), die im Kortex etwas stärker ausgeprägt war.

#### 3.4.2.6 Zytoplasmatisches Färbungsmuster der TAL



**Abbildung 28** TAL zum Vergleich der Struktur der zytosolischen Färbung von Claudin 10 und Claudin 19. Die weißen Kästen in den Abbildungen markieren jeweils den Bereich, der nochmals vergrößert gezeigt wird. **A** Claudin 10 gefärbte TAL **B** Claudin 19 gefärbte TAL.

Die zytosolische Färbung der TAL war in der Claudin 10 bzw. 19 Färbung nicht einheitlich.

Die Claudin 10 Färbung der TAL erschien zytosolisch insbesondere kortikal streifig-säulenartig (Abbildung 28 A). Im OSOM war diese streifig-säulenartige Färbung weniger stark ausgeprägt. Insgesamt wiesen in etwa 77 % der Zellen der TAL des OSOM und Kortex eine intrazelluläre Claudin 10 Färbung auf (Kapitel 3.4.4.2).

Im Gegensatz dazu erschien die zytosolische Claudin 19 Färbung im Kortex vesikulär und war in allen Zellen gleichermaßen ausgeprägt (Abbildung 28 B).

### 3.4.2.7 Schematische Übersicht der IF Ergebnisse

Abbildung 29 gibt eine Übersicht über die in Kapitel 3.4.2 dargestellten Ergebnisse der Claudinfärbungen. Für diese Zusammenfassung wurden die unterschiedlichen kortikomedullären Regionen der Niere und ihr z.T. unterschiedliches Färbeverhalten vereinfacht zusammengefasst.

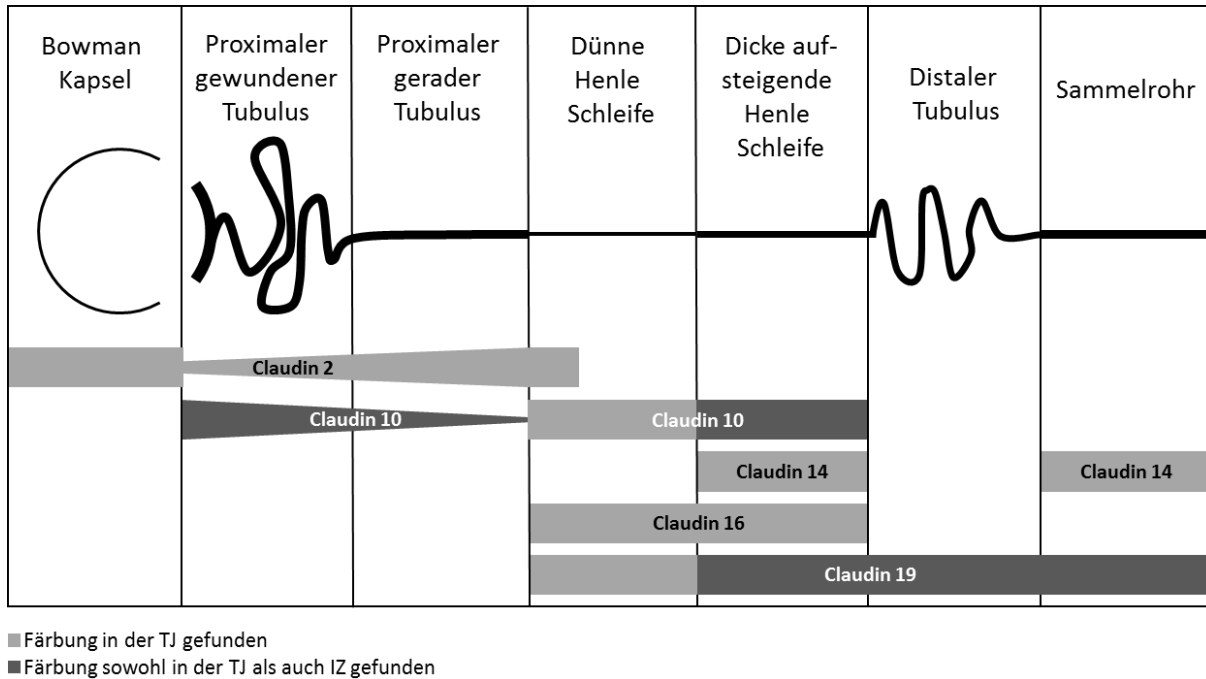
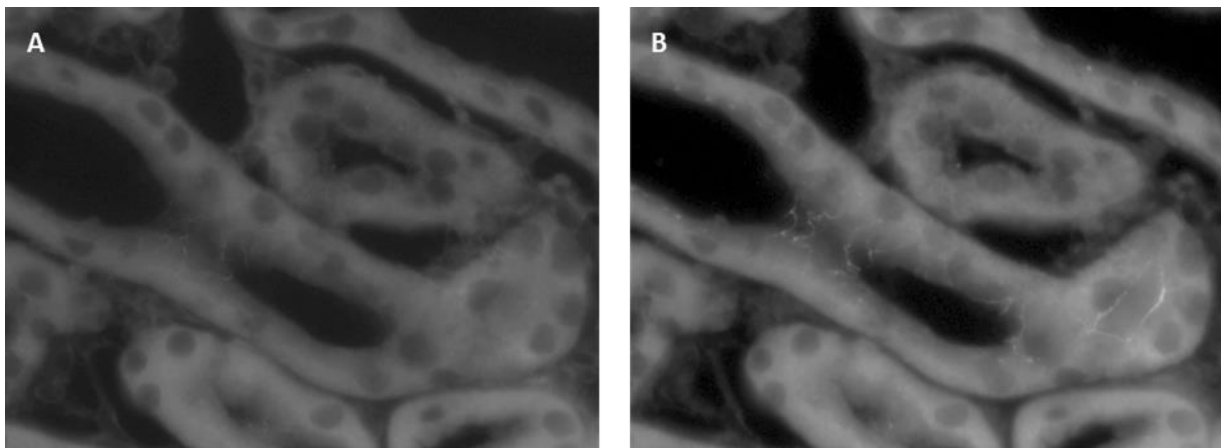
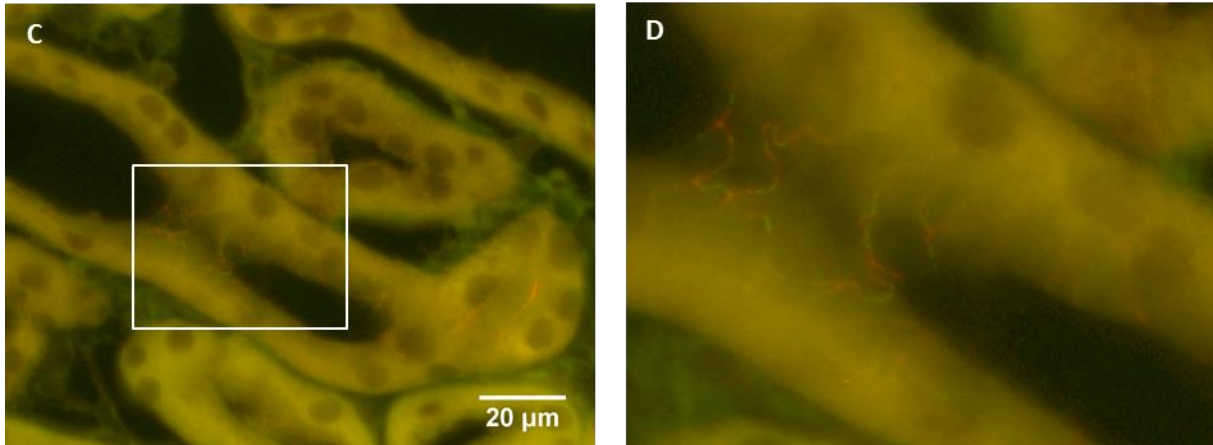


Abbildung 29 Verteilung der Claudine nach Immunfluoreszenzfärbungen.

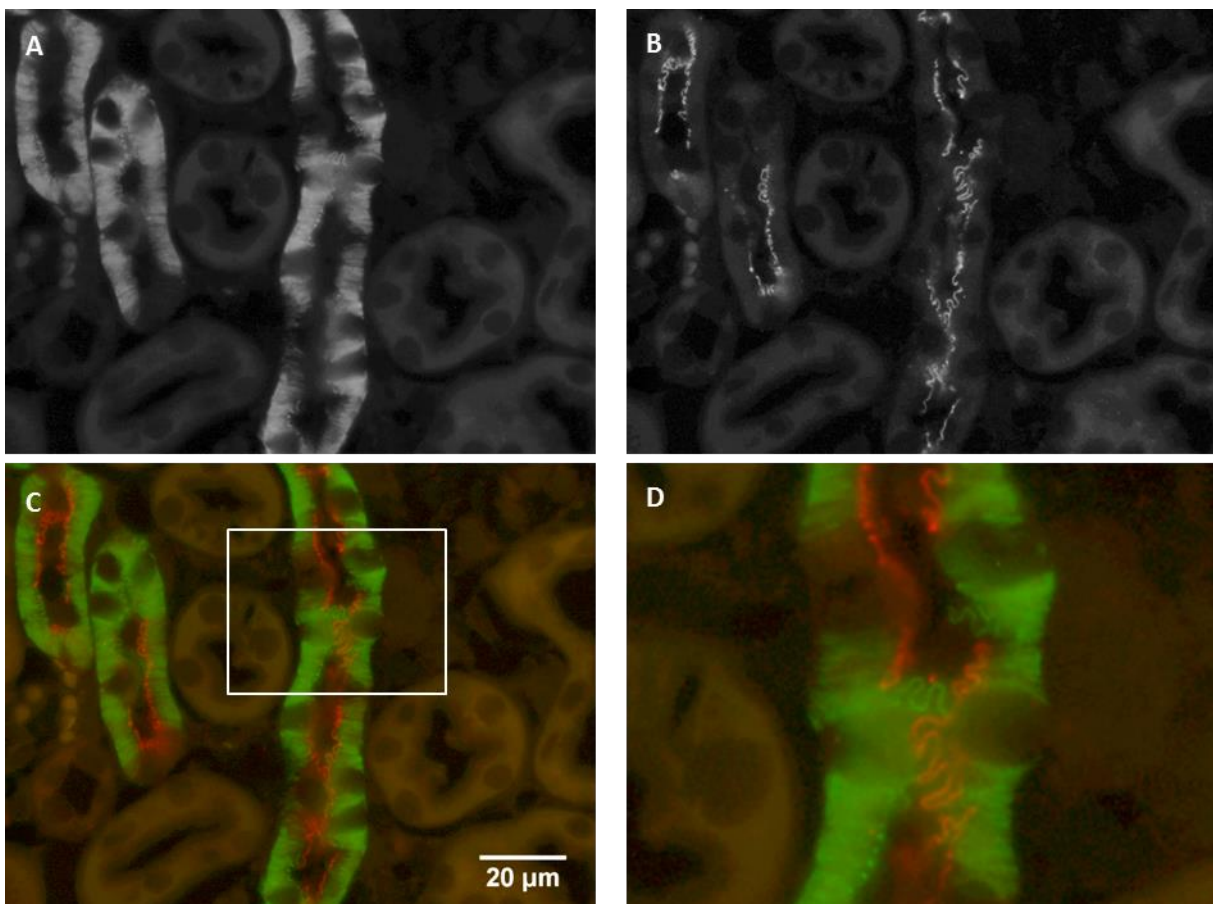
### 3.4.3 Claudindoppelfärbungen

Im PT kamen Claudin 10 und 2 in den TJ im selben Tubulus vor. Meistens wechselten sich Claudin 10 und 2 gefärbte Abschnitte der TJ ab. Überlagerung der Claudin 10 und 2 Färbung an einer Stelle einer TJ kamen nur in sehr geringem Maße vor und waren meist nur punktuell ausgeprägt (Abbildung 30).





**Abbildung 30** Expression von Claudin 10 und 2 im PT. **A** PT im Kortex Claudin 10 gefärbt **B** PT im Kortex Claudin 2 gefärbt **C** Fusionsbild von A Claudin 10 (grün) und B Claudin 2 (rot). Der in C dargestellte Größenbalken gilt ebenso für Abbildung A und B. **D** zeigt den in C mit weißem Kasten markierten Bereich als Detailansicht.



**Abbildung 31** Exklusive Expression von Claudin 10 und Claudin 16 in TAL. **A** Kortex Claudin 10 gefärbt **B** Kortex Claudin 16 gefärbt **C** Fusionsbild von A Claudin 10 (grün) und B Claudin 16 (rot). Der in C dargestellte Größenbalken gilt ebenso für Abbildung A und B. **D** zeigt den in C mit weißem Kasten markierten Bereich als Detailansicht.

In der Claudin 10-16-Kofärbung fanden sich in einer TAL jeweils Claudin 10 und Claudin 16 gefärbte Abschnitte. Allerdings kamen Claudin 10 und 16 nie in einer TJ vor (Abbildung 31). Intrazellulär

Claudin 10 gefärbte Zellen zeigten auch Claudin 16 gefärbte TJ. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen ohne intrazelluläre Claudin 10 Färbung keine Claudin 10 gefärbte TJ in der unmittelbaren Umgebung. Die Claudin 10-19-Kofärbung zeigte in der TAL ebenfalls Claudin 10 und Claudin 19 gefärbte Abschnitte, wobei keine Koexpression zu sehen war.

### 3.4.4 Diätspezifische Ergebnisse der Färbungen in der TAL

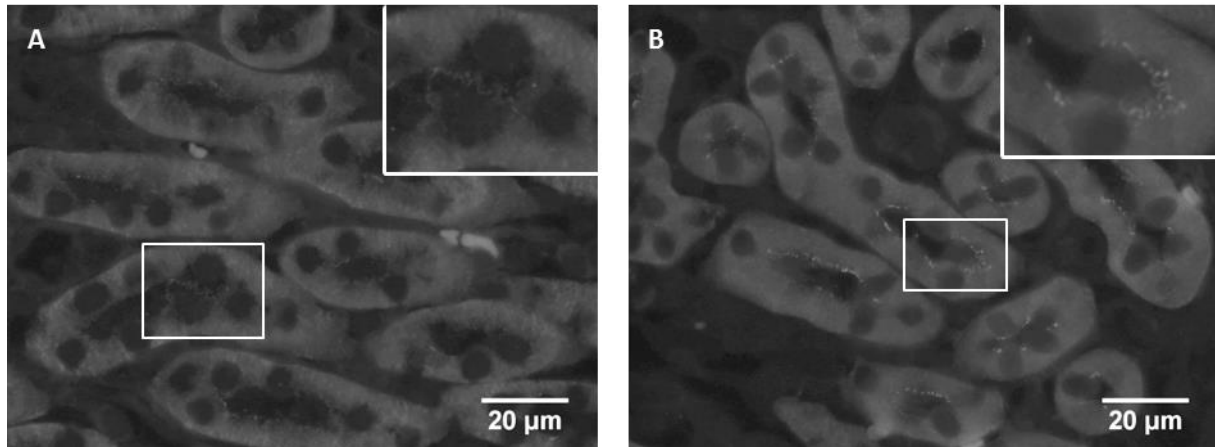
Die folgenden Kapitel dienen der Darstellung der veränderten Claudinproteinexpression unter verschiedenen diätetischen Bedingungen. Es wurden die Nieren der Mäuse, die Kontroll-, Niedrig- und Hochkalzium-, Niedrig- und Hochmagnesiumdiät erhalten hatten, miteinander verglichen. Dazu wurden Färbungen der Nieren aller erwähnten Diäten für Claudin 10, 14, 16 und 19 betrachtet. Das folgende Kapitel dient der Beschreibung der Beobachtungen in der TAL. Dabei bedarf die Claudin 14 Färbung sowie die Färbung von Claudin 10 im ISOM besonderer Aufmerksamkeit.

#### 3.4.4.1 Claudin 10

Im ISOM zeigten sich unter den verschiedenen diätetischen Bedingungen keine Veränderungen der intrazellulär mittelstark ausgeprägten Färbung und kaum Unterschiede der Ausdehnung der gefärbten TJ. Bis auf zwei Nieren wiesen alle Nieren *reichlich* Claudin 10 gefärbte TJ in der TAL auf (Abbildung 32 A und B). Eine Niere der Niedrigmagnesiumdiättiere zeigte eine geringere Ausdehnung der Claudin 10 gefärbten TJ im ISOM (Tabelle 23). Die Stärke der TJ Färbung der *reichlichen* TJ variierte und wurde folgenderweise eingeteilt: *extrem zart*, *sehr zart*, *zart*, *weniger zart*, *gut sichtbar*.

**Tabelle 23** Übersicht der Ausdehnung der gefärbten TJ und der Stärke der TJ Färbung in **TAL im ISOM Claudin 10** gefärbter Nieren unter verschiedenen diätetischen Bedingungen. n = 3 je Diätgruppe, Darstellung der jeweiligen Einzelwerte sowie der daraus resultierenden Mediane nach Diätgruppen (linke Spalte) sortiert. **Ausdehnung der TJ Färbung:** *keine* = 0, *kaum* = 1, *vereinzelt* = 2, *reichlich* = 3. n.b. = nicht beurteilbar. **Stärke der TJ Färbung:** *extrem zart* = 1, *sehr zart* = 2, *zart* = 3, *weniger zart* = 4, *gut sichtbar* = 5.

	Ausdehnung			Median	Stärke			Median
Niedrig Ca <sup>2+</sup>	3	3	3	3	3	3	3	3
Niedrig Mg <sup>2+</sup>	1	3	3	3	1	3	3	3
Kontrolle	3	3	n.b.	3	2	2	2	2
Hoch Ca <sup>2+</sup>	3	3	3	3	5	3	3	3
Hoch Mg <sup>2+</sup>	3	3	3	3	3	5	3	3



**Abbildung 32** Diätetische Unterschiede der Claudin 10 Färbung in der TAL. Die weißen Kästen in den Abbildungen markieren jeweils den Bereich, der nochmals vergrößert gezeigt wird. **A** TAL des ISOM einer Kontrolldiät-tiere mit mittelstarker intrazellulärer Färbung und *reichlich, sehr zarten TJ* **B** TAL des ISOM einer Hochkalziumdiät-tiere mit mittelstarker intrazellulärer Färbung und *reichlich, gut sichtbaren TJ*.

Die Nieren der Kontrolldiät-tiere wiesen die geringste, eine *extrem zarte TJ* Färbung auf (Abbildung 32 A). Niedrigmagnesium- und Niedrigkalziumdiät-tiere zeigten in den TAL des ISOM etwas stärker Claudin 10 gefärbte TJ, deren Färbung stärker als in Abbildung 32 A und schwächer als in Abbildung 32 B ausgeprägt war.

Hochmagnesium- und Hochkalziumdiät-tiere zeigten *zarte bis gut sichtbare* Claudin 10 gefärbte TJ in den TAL des ISOM. Der Median der Stärke der TJ Färbung unterschied sich nicht von dem der Niedrigmagnesium- und Niedrigkalziumdiät-tiere. Abbildung 32 B zeigt die *gut sichtbare TJ* Färbung einer Hochkalziumdiät-tiere als maximale Ausprägung der TJ Färbung dieser Diätgruppe in der TAL des ISOM.

Kortikal und im OSOM waren unter den verschiedenen diätetischen Bedingungen keine Unterschiede zur im Kapitel 3.4.2.2 beschriebenen Claudin 10 Färbung der TAL zu sehen.

#### 3.4.4.2 Anzahl Claudin 10 gefärbter Zellen in TAL aus Kortex und OSOM

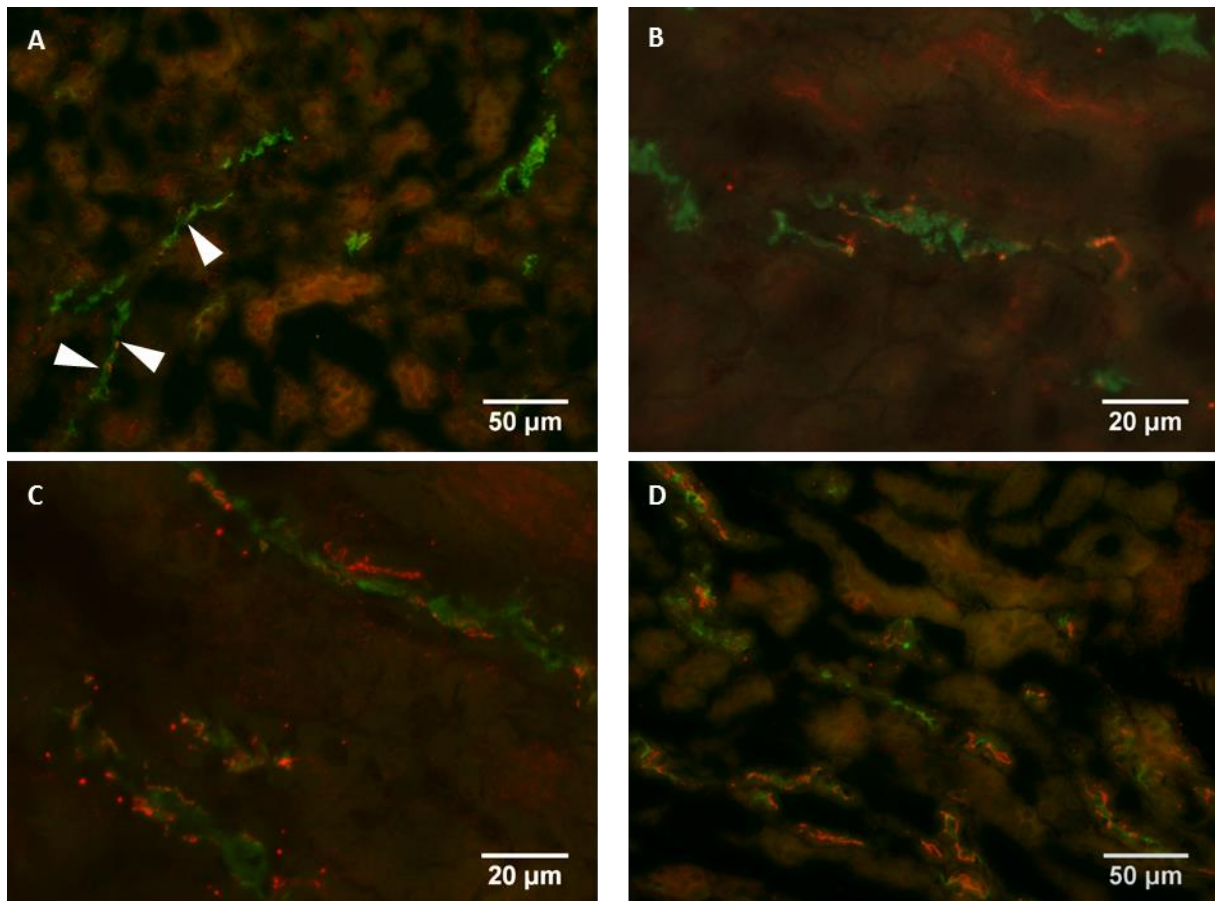
In den TAL der Claudin 10 gefärbten Nieren waren in Kortex und OSOM Zellen mit und ohne intrazellulärer Claudin 10 Färbung zu sehen. Tabelle 24 zeigt eine Übersicht der je Niere in 20 TAL gezählten Zellanzahl und deren anteilig intrazellulär gefärbten bzw. ungefärbten Zellen. Prozentual waren in den 60 TAL der Kontrolldiät-tieren 656 von 851 Zellen, d. h. 77 % der Zellen intrazellulär Claudin 10 gefärbt. In den 60 TAL der Hochkalziumdiät-tieren waren 728 von 930 Zellen, d. h. 78 % der Zellen intrazellulär Claudin 10 gefärbt. Der Anteil intrazellulär Claudin 10 gefärbter Zellen der TAL unterschied sich zwischen den Nieren der Kontroll- und Hochkalziumdiät nicht.



**Tabelle 24** Übersicht der Anzahl Claudin 10 gefärbter Zellen in TAL von Mäusen, die Kontroll- bzw. Hochkalziumdiät erhalten hatten. Es wurden jeweils 20 TAL aus 3 Nieren je Diätgruppe ausgezählt.

Tier	Kontrolldiät					Hochkalziumdiät				
	A	B	C	$\Sigma$	%	D	E	F	$\Sigma$	%
Gesamtzahl der gezählten Zellen	291	275	285	<b>851</b>	100	303	301	326	<b>930</b>	100
davon Claudin 10 gefärbte Zellen	231	207	218	<b>656</b>	<b>77</b>	227	234	267	<b>728</b>	<b>78</b>
davon nicht Claudin 10 gefärbte Zellen	60	68	67	<b>195</b>	23	76	67	59	<b>202</b>	22

#### 3.4.4.3 Claudin 14



**Abbildung 33** Verteilung von Claudin 14 (rot) in Nieren verschiedener Diättiere. Zur Identifikation der TAL diente die Kofärbung mit NKCC2 (grün). **A** kaum TJ gefärbt je TAL einer Kontrolldiättiere **B** einige TJ gefärbt je TAL einer Kontrolldiättiere **C** reichlich TJ gefärbt je TAL einer Hochkalziumdiättiere **D** Übersicht über TAL aus Hochkalziumdiättiere

Die Ausprägung des junctional lokalisierten Claudin 14 unterschied sich zwischen den verschiedenen Diättieren in der TAL. Die Claudin 14 Färbung der TJ der TAL beschränkte sich auf den Kortex und OSOM, zwischen denen in der unfixierten Niere nicht unterschieden werden konnte. Im ISOM fand sich in keiner Diät eine TJ Färbung in der TAL.

Die TAL wurden im unfixierten Nierenschnitt durch die Kofärbung mit NKCC2 aufgefunden. Die unterschiedliche Ausprägung der TJ Färbung unterschied sich zum einen durch den Anteil der TAL, die eine Claudin 14 Färbung der TJ aufwiesen, zum anderen in der Ausdehnung der TJ selbst. Die Stärke der Claudin 14 TJ Färbung war in allen Diäten kräftig.

Zur Unterscheidung der Ausdehnung der TJ wurden die folgenden Kategorien genutzt, die in Abbildung 33 A bis C gezeigt werden: *kaum*, *einige*, *reichlich*. Die Ergebnisse dieser Kategorisierung sowie der Anteil der TAL mit TJ Färbung sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

**Tabelle 25** Veränderungen der Expression von **Claudin 14 in TAL in Kortex/ OSOM** nach Diätgruppen (linke Spalte) sortiert. n = 3 je Diätgruppe, Darstellung der jeweiligen Einzelwerte sowie des Mittelwertes bzw. des Medians. **Anteil** bezeichnet den prozentualen Anteil von TAL mit TJ Färbung im Verhältnis zu allen TAL. Die **Ausdehnung** der Claudin 14 gefärbten TJ je TAL wurde folgenderweise eingeteilt: *kaum* = 1, *einige* = 2, *reichlich* = 3. Die Kategorien sind in Abbildung 33 dargestellt.

	Anteil [%]			Mittelwert	Ausdehnung			Median
Niedrig Ca <sup>2+</sup>	20	20	20	20	1	1	1	1
Niedrig Mg <sup>2+</sup>	30	10	30	23	2	1	2	2
Kontrolle	20	30	20	23	2	1	1	1
Hoch Ca <sup>2+</sup>	<b>70</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>73</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Hoch Mg <sup>2+</sup>	50	60	50	53	2	3	3	3

Die geringste Menge Claudin 14 in der TJ fand sich in den Nieren der Niedrigkalziumdiättiere. In dieser Gruppe zeigten durchschnittlich 20 % der TAL *kaum* Claudin 14 gefärbte TJ.

Die Claudin 14 Färbung ähnelte sich in den Nieren der Kontroll- und Niedrigmagnesiumdiättiere. Durchschnittlich waren in beiden Gruppen 23 % der TAL junctional Claudin 14 gefärbt. Der Median der Ausdehnung der TJ Färbung lag mit *kaum* in den Nieren der Kontrolldiättiere jedoch etwas niedriger als der Median mit *einige* in der Gruppe der Niedrigmagnesiumdiättiere. Allerdings beruht dieser Unterschied lediglich auf der geringfügig höheren Ausdehnung der junctionalen Färbung in einer der untersuchten Nieren.

Deutlich stärker war die Expression von Claudin 14 in den Hochmagnesiumdiätneren. Durchschnittlich 53 % der TAL waren junctional Claudin 14 gefärbt. Nicht nur der Anteil der TAL mit TJ Färbung war höher, sondern auch die Ausdehnung der gefärbten TJ. Der Median lag hier bei *reichlich*, wobei eine Niere nur *einige* Claudin 14 gefärbte TJ, zwei Nieren *reichlich* gefärbte TJ zeigten.

Die mit Abstand am stärksten ausgeprägte Claudin 14 Expression in der TAL zeigten die Nieren der Hochkalziumdiättiere. Im Durchschnitt zeigten 73 % der TAL eine TJ Färbung. In allen Nieren waren dabei *reichlich* Claudin 14 gefärbte TJ zu sehen.

Eine Beurteilung der intrazellulären Färbung war in den Claudin 14 gefärbten Nieren, auf Grund der Nutzung unfixierter Nierenschnitte, nicht möglich.

#### 3.4.4.4 Claudin 16 und 19

Die Färbungen der Nieren der Diättiere ergaben keine Unterschiede für Claudin 16 und Claudin 19.

### 3.4.5 Diätspezifische Ergebnisse der Färbungen in anderen Abschnitten der Niere

Die Betrachtung der Claudin 10, 14, 16 und 19 Färbungen in den Nierenschnitten der Diätmäuse ergab für die Färbungen von Claudin 10, 14 und 19 weitere Unterschiede in anderen Nephronabschnitten. Dabei bedarf die Claudin 10 Färbung im PT des OSOM sowie die Färbung von Claudin 19 im DCT besonderer Aufmerksamkeit.

#### 3.4.5.1 Claudin 10 im proximalen Tubulus

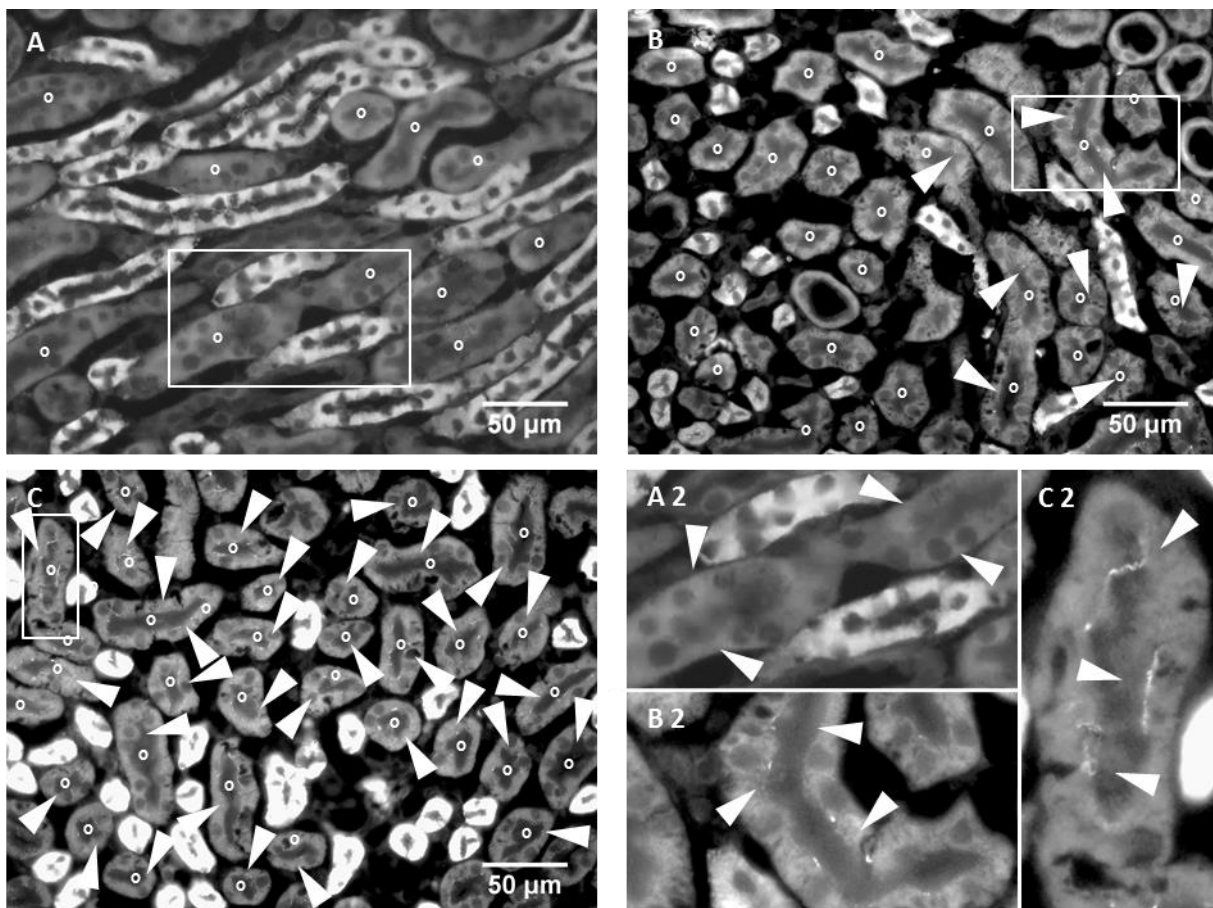
Die intrazelluläre Färbung im PT war stets extrem schwach und unterschied sich weder zwischen den PT des Kortex und des OSOMs einer Niere noch zwischen den verschiedenen Diäten.

Im Kortex unterschieden sich die Claudin 10 gefärbten TJ nicht. Die TJ waren stets *zart* und kamen *reichlich* vor. Im Gegensatz dazu waren die Claudin 10 gefärbten TJ im OSOM stets *sehr zart* und unterschieden sich hinsichtlich der Ausdehnung ihres Auftretens. Um die verschiedenen Nierenschnitte zu beschreiben wurden vier Kategorien festgelegt: *keine* TJ, *kaum* TJ, *vereinzelt* TJ, *reichlich* TJ. Die festgelegten Kategorien *keine*, *vereinzelt* und *reichlich* TJ werden in Abbildung 34 gezeigt. Die vergebene Kategorie *kaum* unterschied sich nur beim Mikroskopieren, nicht im aufgenommenen Bild, und wurde vergeben, wenn wenige Claudin 10 gefärbte TJ vorhanden waren, so dass die Kategorie *vereinzelt* nicht erreicht wurde.

Nach Diätgruppen sortiert zeigt Tabelle 26 einen Überblick der Ausdehnung Claudin 10 gefärbter TJ im PT des OSOM. Die geringste Ausdehnung von Claudin 10 in den TJ (Median *keine*) fand sich in den Nieren der Niedrigmagnesiumdiättiere. Der Median der Ausdehnung der gefärbten TJ unterschied sich in allen anderen Gruppen nicht und betrug zwei, entsprechend einer *vereinzelt* Färbung von TJ.

**Tabelle 26** Übersicht über die vergebenen Kategorien der Ausdehnung **Claudin 10** gefärbter TJ im **PT des OSOM**. n = 3 je Diätgruppe, Darstellung der jeweiligen Einzelwerte sowie der daraus resultierenden Mediane nach Diätgruppen (linke Spalte) sortiert. **Ausdehnung der TJ Färbung:** Keine = 0, kaum = 1, vereinzelt = 2, reichlich = 3.

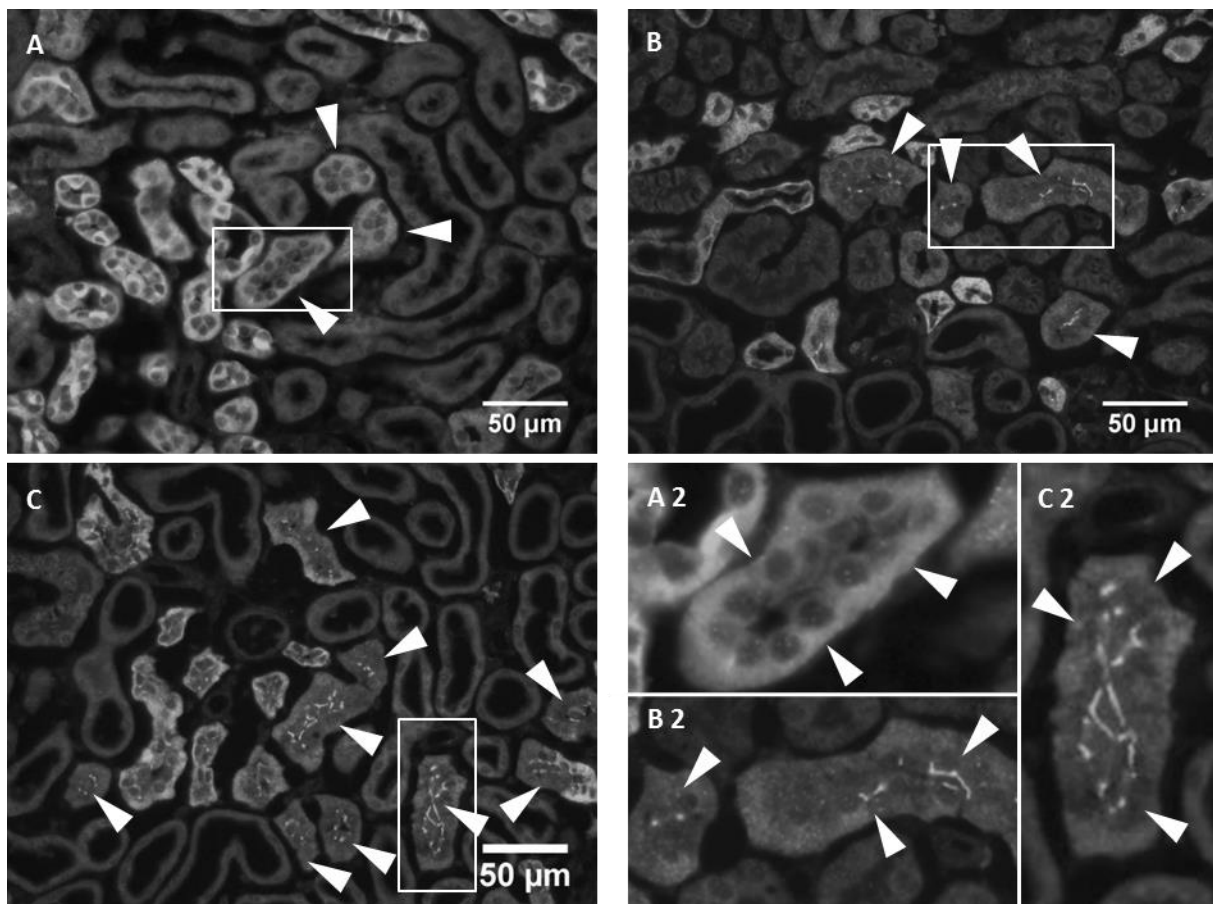
	Ausdehnung			Median
Niedrig Ca <sup>2+</sup>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
Niedrig Mg <sup>2+</sup>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Kontrolle	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
Hoch Ca <sup>2+</sup>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
Hoch Mg <sup>2+</sup>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>



**Abbildung 34** Kategorien für die Ausdehnung Claudin 10 gefärbter TJ im PT des OSOM. Die weißen Kästen in den Abbildungen markieren jeweils den Bereich, der nochmals vergrößert gezeigt wird. ° = PT. **A** keine TJ Färbung **B** vereinzelt TJ Färbung, in vielen PT finden sich keine Claudin 10 gefärbten TJ **C** reichlich TJ Färbung **A 2**, **B 2** und **C 2** zeigen jeweils die mit weißen Kästen markierten Bereiche aus den Abbildungen A, B und C vergrößert.

### 3.4.5.2 Claudin 19 im distalen Konvolut

Die Menge der Claudin 19 gefärbten TJ im DCT variierte zwischen den unterschiedlichen diätetischen Bedingungen. Es wurden die folgenden drei Gruppen definiert: *kaum* Claudin 19 gefärbte TJ, mit der Kamera nicht festhaltbares, lediglich punktuell Vorkommen von Claudin 19 im DCT (Abbildung 35 A), *einige* Claudin 19 gefärbte TJ, linienförmig erscheinend im DCT (Abbildung 35 B), sowie *reichlich* Claudin 19 gefärbte TJ im DCT (Abbildung 35 C), die annähernd vollständig netzartig, wie in den Occludin gefärbten TJ des DCT, aussahen.



**Abbildung 35** DCT mit unterschiedlich viel junktional gefärbten Claudin 19, die weißen Pfeilspitzen weisen jeweils auf DCT. Die weißen Kästen in den Abbildungen markieren jeweils den Bereich, der nochmals vergrößert gezeigt wird. **A** kaum Claudin 19 in der TJ gefärbt **B** einige TJ Claudin 19 gefärbt **C** reichlich TJ Claudin 19 gefärbt **A 2**, **B 2** und **C 2** zeigen jeweils die mit weißen Kästen markierten Bereiche aus den Abbildungen A, B und C vergrößert.

Die geringste Lokalisation von Claudin 19 in der TJ zeigte sich in den Nieren der Hochmagnesiumdiättiere. Bei diesen waren in allen drei Nieren *kaum* Claudin 19 gefärbte TJ zu sehen (wie Abbildung 35 A). Etwas mehr junktional lokalisiertes Claudin 19 fand sich in den Nieren der Kontrolldiättiere. Diese wurden in allen drei Fällen mit *kaum* bis *einige* Claudin 19 gefärbte TJ beschrieben (Abbildung 35 A und B). *Einige* Claudin 19 gefärbte TJ wurden in den Nieren der

Niedrigmagnesium- und Hochkalziumdiättiere gefunden (Abbildung 35 B). Am meisten Claudin 19 in der TJ (*reichlich*, Abbildung 35 C) fand sich in den Nieren der Niedrigkalziumdiättiere.

Tabelle 27 zeigt, nach Diätgruppen sortiert, einen Überblick der Ausdehnung Claudin 19 gefärbter TJ im DCT in den verschiedenen Diätgruppen.

**Tabelle 27** Übersicht über die vergebenen Kategorien der Ausdehnung **Claudin 19** gefärbter TJ im **DCT**. n = 3 je Diätgruppe, Darstellung der jeweiligen Einzelwerte sowie der daraus resultierenden Mediane nach Diätgruppen (linke Spalte) sortiert. **Ausdehnung der TJ Färbung:** *Kaum* = 1, *einige* = 2, *reichlich* = 3.

	Ausdehnung			Median
Niedrig Ca <sup>2+</sup>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Niedrig Mg <sup>2+</sup>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
Kontrolle	<b>1-2</b>	<b>1-2</b>	<b>1-2</b>	<b>1-2</b>
Hoch Ca <sup>2+</sup>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
Hoch Mg <sup>2+</sup>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

### 3.4.5.3 Claudin 14 im Sammelrohr

In den Claudin 14 gefärbten Nierenschnitten veränderten sich zwischen den Diäten zum einen die Anzahl der CD mit TJ Färbung sowie die Ausdehnung der Claudin 14 gefärbten TJ und die Stärke der Färbung. In allen Diäten waren v. a. TJ in CD im äußeren Bereich des Kortex Claudin 14 gefärbt. Eine tabellarische Übersicht über diese Ergebnisse liefern Tabelle 28 und Tabelle 29.

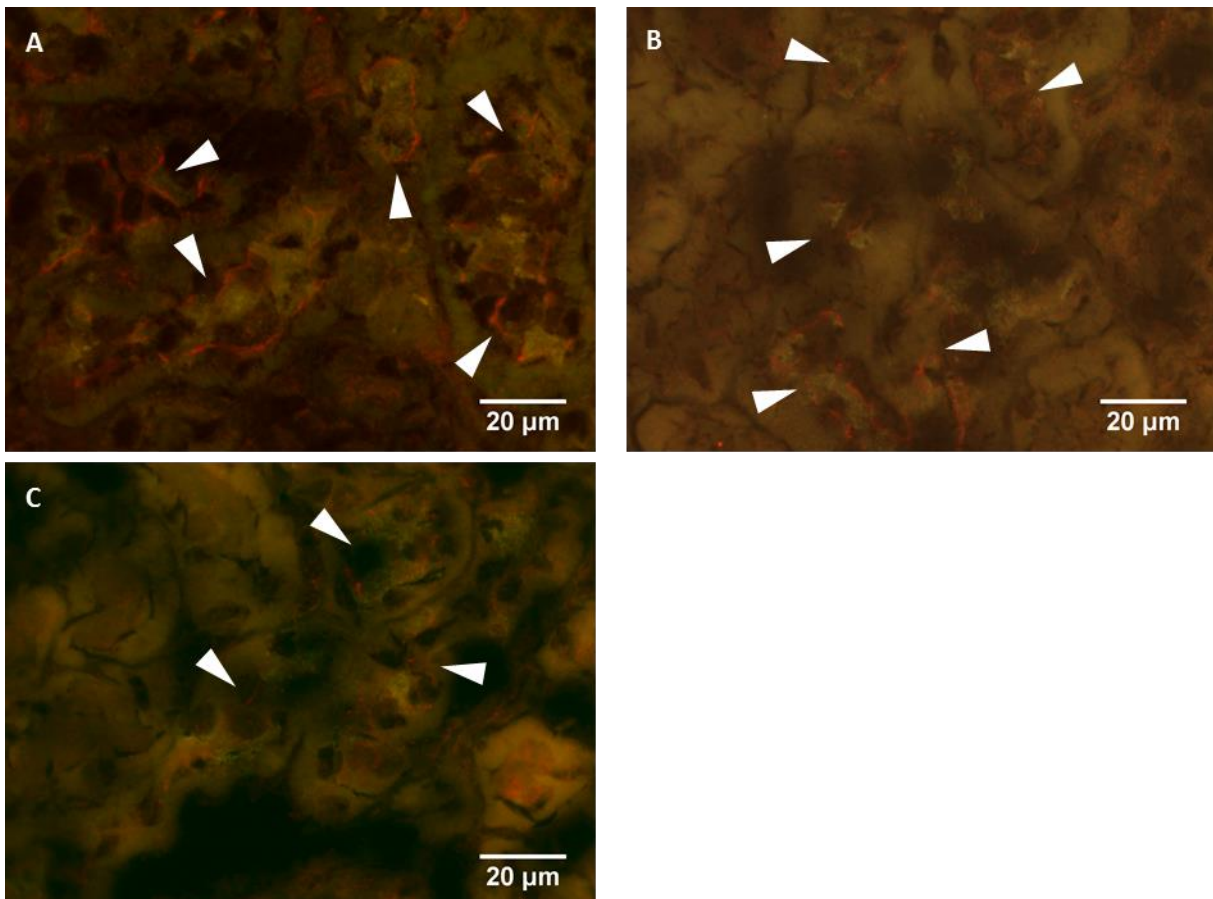
Die Claudin 14 gefärbten TJ in den Nieren der Kontrolldiättiere kamen in durchschnittlich 87 % der CD im äußeren Bereich des Kortex vor. Dabei glich ihr Erscheinungsbild mit einigen TJ je CD, die stets gut sichtbar gefärbt waren, dem in Abbildung 36 A gezeigten.

Die Nieren der Niedrigkalzium- und Niedrigmagnesiumdiät glichen denen der Kontrolldiät in Bezug auf die Claudin 14 gefärbten TJ des CD weitestgehend, wobei die Stärke der TJ Färbung in den Nieren der Niedrigmagnesiumdiättiere etwas geringer ausgeprägt war.

Die Nieren der Hochkalziumdiättiere zeigten durchschnittlich in 83 % der im äußeren Bereich des Kortex gelegenen CD Claudin 14 gefärbte TJ. Diese waren in ihrer Ausdehnung mit denen der Kontrolldiättiere vergleichbar. Die Stärke der TJ Färbung war insgesamt deutlich geringer ausgeprägt als in den Kontrolldiättieren. Der Median der Stärke der TJ Färbung lag bei den Hochkalziumdiättieren bei *weniger zart*.

**Tabelle 28** Prozentualer Anteil der CD mit TJ Färbung von Claudin 14 im äußeren Bereich des Kortex. n = 3 je Diätgruppe, Darstellung der jeweiligen Einzelwerte sowie des Mittelwertes.

	Anteil [%]			Mittelwert
Niedrig Ca <sup>2+</sup>	80	70	90	80
Niedrig Mg <sup>2+</sup>	90	90	80	87
Kontrolle	90	90	80	87
Hoch Ca <sup>2+</sup>	90	80	80	83
Hoch Mg <sup>2+</sup>	50	70	50	57



**Abbildung 36** Claudin 14 (rot) und B1-V-ATPase (grün) Aufnahmen aus dem äußeren Bereich des Kortex. Die weißen Pfeilspitzen weisen auf junctional Claudin 14 gefärbte CD. **A** einige, gut sichtbare Claudin 14 gefärbte TJ aus einer Kontrolldiätmaiere **B** einige, zart erscheinende Claudin 14 gefärbte TJ aus einer Hochkalziumdiätmaiere **C** vereinzelt, zart erscheinende Claudin 14 gefärbte TJ aus einer Hochmagnesiumdiätmaiere

**Tabelle 29** Veränderungen der Expression von **Claudin 14 im CD** im äußeren Bereich des **Kortex** nach Diätgruppen (linke Spalte) sortiert. n = 3 je Diätgruppe, Darstellung der jeweiligen Einzelwerte sowie der Mediane. Die **Ausdehnung** der Claudin 14 gefärbten TJ je CD wurde folgenderweise eingeteilt: *kaum* = 1, *vereinzelt* = 2, *einige* = 3, *reichlich* = 4. Die **Stärke der TJ Färbung** wurde wie folgt kategorisiert: *zart* = 1, *weniger zart* = 2, *gut sichtbar* = 3.

	Ausdehnung			Median	Stärke			Median
Niedrig Ca <sup>2+</sup>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Niedrig Mg <sup>2+</sup>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2-3</b>	<b>3</b>
Kontrolle	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Hoch Ca <sup>2+</sup>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
Hoch Mg <sup>2+</sup>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1-2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1-2</b>

Die geringste Ausprägung der Claudin 14 gefärbten TJ im CD des äußeren Bereichs des Kortex war in den Nieren der Hochmagnesiumdiättiere zu finden. Hier zeigten durchschnittlich nur 50 bis 70 % der CD eine TJ Färbung, die in ihrer Ausdehnung und Stärke der Färbung geringer ausgeprägt war (Abbildung 36 C) als in allen anderen Diäten.

Die intrazelluläre Färbung konnte in den unfixierten Nierenschnitten nicht beurteilt werden.

#### 3.4.5.4 Claudin 19 im Sammelrohr

In der Claudin 19 Färbung zeigten sich im kortikalen CD stets *gut sichtbare* TJ. Zur Beurteilung der Ausdehnung der Claudin 19 Färbung der TJ erfolgte die Einteilung in *kaum*, *einige* und *reichlich* TJ Claudin 19 gefärbt (Abbildung 37). Tabelle 30 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse.

Die geringste Ausdehnung Claudin 19 gefärbter TJ, die mit der Ausdehnung der TJ Färbung in den Kontrolldiätieren vergleichbar war, zeigte sich in den Hoch- und Niedrigmagnesiumdiätieren.

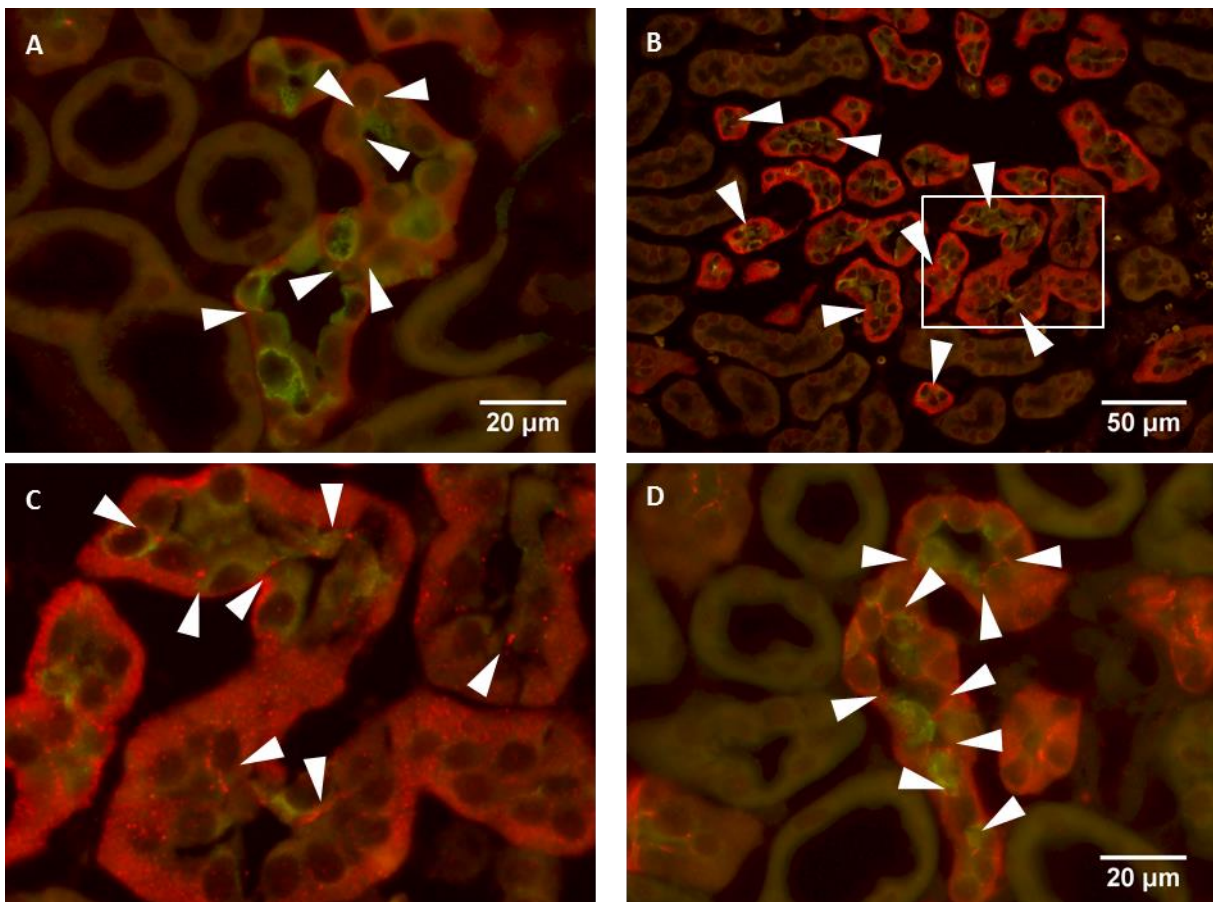
In den Nieren der Hochkalziumdiättiere ergab sich eine hohe intradiätetische Variabilität. Die Claudin 19 Färbung der TJ wurde mit *kaum*, *einige* und *einige* bis *reichlich* beurteilt.

Die weiteste Ausdehnung der Claudin 19 Färbung der TJ fand sich in den Nieren der Niedrigkalziumdiätieren, die Kategorie *reichlich* wurde dreimal vergeben.



**Tabelle 30** Veränderungen der Expression von **Claudin 19** in CD im äußeren Bereich des **Kortex** nach Diätgruppen (linke Spalte) sortiert. n = 3 je Diätgruppe, Darstellung der jeweiligen Einzelwerte sowie des Medians. Die **Ausdehnung** der Claudin 19 gefärbten TJ je CD wurde folgenderweise eingeteilt: *kaum* = 1, *einige* = 2, *reichlich* = 3. Die Kategorien sind in Abbildung 37 dargestellt.

	Ausdehnung			Median
Niedrig Ca <sup>2+</sup>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Niedrig Mg <sup>2+</sup>	1	1	1	1
Kontrolle	1	1	1-2	1
Hoch Ca <sup>2+</sup>	1	2	2-3	2
Hoch Mg <sup>2+</sup>	1	1	1	1



**Abbildung 37** Kortikale CD mit unterschiedlich viel junctional gefärbten Claudin 19 (rot). Gegenfärbung mit B1-V-ATPase (grün). Weiße Pfeilspitzen weisen auf Claudin 19 gefärbte TJ. Der weiße Kasten in der Abbildung markiert den Bereich, der nochmals vergrößert gezeigt wird. **A** *kaum* TJ Claudin 19 gefärbt **B** *einige* TJ Claudin 19 gefärbt **C** zeigt den mit weißem Kasten markierten Bereich aus Abbildung B vergrößert **D** *reichlich* TJ Claudin 19 gefärbt.

### 3.4.6 Tabellarische Übersicht der diätetisch veränderten Claudin 10, 14, 16 und 19 Expression

Abbildung 31 zeigt eine Übersicht der in Kapitel 3.4.4 und 3.4.5 dargestellten Ergebnisse der Claudinfärbungen der Mäusenieren unter den verschiedenen Salzbelastungen.

**Tabelle 31** Übersicht der in den verschiedenen Diäten und Claudinfärbungen beobachteten Unterschiede der TJ Färbung. = entspricht unveränderter TJ Färbung im Vergleich zur Kontrolldiät. ↓ = etwas weniger, ↓↓ = weniger, ↓↓↓ = deutlich weniger TJ gefärbt als in der Kontrolldiät, ↑ = etwas mehr, ↑↑ = mehr, ↑↑↑ = deutlich mehr TJ gefärbt als in der Kontrolldiät.

	PT	TL	TAL	DCT	CD
<b>Kontrolldiät</b>	Claudin 10	Claudin 10 Claudin 16 Claudin 19	Claudin 10 Claudin 14 Claudin 16 Claudin 19	Claudin 19	Claudin 14 Claudin 19
<b>Niedrigkalziumdiät</b>	10 =	10 = 16 = 19 =	<b>10 ↑</b> 14 = 16 = 19 =	<b>19 ↑↑</b>	14 = <b>19 ↑↑</b>
<b>Hochkalziumdiät</b>	10 =	10 = 16 = 19 =	<b>10 ↑</b> <b>14 ↑↑↑</b> 16 = 19 =	<b>19 ↑</b>	<b>14 ↓↓</b> 19 =
<b>Niedrigmagnesiumdiät</b>	<b>10 ↓</b>	10 = 16 = 19 =	<b>10 ↑</b> 14 = 16 = 19 =	19 =	14 = 19 =
<b>Hochmagnesiumdiät</b>	10 =	10 = 16 = 19 =	<b>10 ↑</b> <b>14 ↑↑</b> 16 = 19 =	19 =	<b>14 ↓↓↓</b> 19 =

## **4. Diskussion**

### **4.1 Methoden**

#### **4.1.1 Versuchstiere**

Zur Untersuchung der Claudinexpression unter Berücksichtigung der Kalzium-Phosphat-Magnesium-Homöostase wurden junge, weibliche Mäuse als Versuchstiere genutzt. In der Literatur finden sich Hinweise, dass die Reabsorption divalenter Kationen in der TAL in jungen, heranwachsenden Mäusen geringer ausgeprägt ist als in älteren, erwachsenen Mäusen. Ebenso besitzen männliche Tiere grundsätzlich eine im Vergleich zu weiblichen Tieren erhöhte Reabsorptionsleistung für divalente Kationen in der TAL (84). Die beobachteten Veränderungen müssen daher stets in Bezug auf das Alter der Tiere gesetzt werden und zeigen lediglich die Veränderungen in weiblichen Mäusen. Die Daten aus den beiden Gruppen, zum einen der etwa neun Wochen alten Mäuse der Kalzium- zum anderen der etwa sechs Wochen alten Mäuse der Magnesiumdiätgruppe, werden deshalb nicht direkt verglichen.

#### **4.1.2 Auswahl der unter den verschiedenen Diätbedingungen untersuchten Claudine**

Einige Claudine, deren Expression bereits in der TAL nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 1.3.3), fanden aus diversen Gründen keine Berücksichtigung bei der Beurteilung von Claudinexpressionsunterschieden in der TAL. Die Expression von Claudin 3 wurde in verschiedenen Untersuchungen unterschiedlich beurteilt, außerdem zeigten Zellkulturuntersuchungen eine abdichtende Wirkung dieses Claudins (62). Für Claudin 17 wurde eine von proximal nach distal abnehmende Expression, sowie eine anionenspezifische Porenbildung in der Zellkultur gezeigt (54). Claudin 18 wird insbesondere in den TJ von Magen und Lunge exprimiert, während es bisher für die Expression in der Niere einige kontroverse Literatur in Bezug auf die Expression in der TAL gibt und keine funktionellen Daten vorhanden sind (83, 9).

Insbesondere auf Grund der limitierten Menge an zur Verfügung stehendem Material, beschränkte sich die Untersuchung einer veränderten Claudinexpression daher auf die Claudine 10, 14, 16 und 19, für die bereits eine kationenspezifische Porenbildung bzw. eine Beteiligung an der Kalzium-Phosphat-Magnesium-Homöostase bekannt war.

#### **4.1.3 Real time RT-PCR**

Bei der Wahl der Primerpaare wurde auf eine Produktgröße im Bereich von 80 bis maximal 150 bp geachtet. Ein kurzes Produkt kann bei der Durchführung einer real time PCR zur Erzielung einer zufriedenstellenden Effizienz beitragen (15). In jedem Elongationsschritt wird so die vollständige DNA-Synthese erleichtert.

Zu Gunsten der Vergleichbarkeit wurde auf die Quantifizierung mittels verschiedener Referenzgene für Claudin 10b, 16 und 19 im Vergleich zu den niedrig exprimierten Zielgenen Claudin 10a und 14 verzichtet, v. a. da das Ausgangsmaterial stark limitiert war.

#### **4.1.4 Western Blot**

Die Proben für den Western Blot stammten sowohl von kortikalen als auch von medullären TAL, wobei der Anteil der TAL aus dem ISOM, bedingt durch die Art der Probengewinnung, wahrscheinlich am geringsten ausfiel. Die dicht gepackten Tubulussegmente des Nierenmarks lassen sich im Vergleich zum Kortex mutmaßlich weniger gut enzymatisch-mechanisch auftrennen. Funktionell und in Bezug auf die Claudin 10 Expression bestehen jedoch relativ große Unterschiede entlang der kortikomedullären Achse (siehe Abbildung 24 H und I (65)), so dass eventuelle Expressionsänderungen von Claudin 10 in den TAL des ISOM mit dieser Methode übersehen wurden.

Claudin 10 scheint zusätzlich zu seinem junctionalen Vorkommen in größeren Mengen intrazellulär exprimiert zu sein ((9) und eigene Bilder in Abschnitt 3.4.2.2). Da zudem außer der Zugabe von Auftragspuffer nach Lämmli keine spezielle Aufarbeitung der TAL Proben erfolgte, ist davon auszugehen, dass Proteine der gesamten Zelle gleichermaßen in den Proben enthalten waren. Dies erschwert die Aussage des WB in Bezug auf eine mögliche Veränderung der junctionalen Claudin 10 Expression.

#### **4.1.5 Immunfluoreszenzfärbungen**

##### *4.1.5.1 Veränderte junctionale Claudinexpression*

Grundsätzlich lassen sich in Immunfluoreszenzfärbungen v. a. qualitative Unterschiede erfassen. Eine deutlich veränderte Rekrutierung eines Claudins in die TJ könnte sich in den Immunfluoreszenzfärbungen dennoch durch eine Zu- oder Abnahme der Färbeintensität zeigen (quantitative Veränderung). Geringfügige quantitative Veränderungen sind bei einer geringen Stichprobengröße von drei durch z. B. objekträger-spezifisches Färbeverhalten sehr fehleranfällig. Eine Verdichtung oder Ausdünnung des gefärbten TJ Netzwerks im Rahmen einer veränderten Rekrutierung von Claudinen in die TJ als qualitativ unterschiedliche Färbung ist grundsätzlich besser beurteilbar.

Auf Grund der geringen Stichprobengröße, der zum Teil stark mäandrierenden Form der TJ sowie der teilweise ausgeprägten intrazellulären Färbung (vergleiche Abschnitt 3.4.2.6) wurde auf eine computergestützte Auswertung der Immunfluoreszenzbilder zur Quantifizierung der junctionalen Claudinexpression verzichtet. Insbesondere das inhomogene Hintergrundsignal hätte eine solche Auswertung deutlich erschwert (82).

Für das menschliche Auge waren die TJ stets gut abgrenzbar. Um auf diese Weise eine Beurteilung zu ermöglichen, erfolgte die Beschreibung der TJ Färbung nach den in Abschnitt 2.7.4 geschilderten Gesichtspunkten.

#### 4.1.5.2 *Claudin 10*

Der für die Claudin 10 Färbungen verwandte Antikörper detektiert sowohl Claudin 10a als auch 10b. Eine Unterscheidung der Isoformen, die insbesondere unter funktionellen Gesichtspunkten wichtig erscheint, muss daher durch andere Verfahren erfolgen (36).

#### **4.1.6 Posttranslationale Modifikationen**

Posttranslationale Modifikationen der Claudine, wie die Phosphorylierung von Claudin 16 in Zellkulturexperimenten (47), können zu einer veränderten Lokalisation des Claudins führen. Sie können durch die angewandten Methoden indirekt beobachtet werden. Hingegen bleiben posttranslationale Modifikationen der Claudine, die zu einer veränderten Funktion führen, durch die angewandten Methoden unbeachtet.

## **4.2 Ergebnisse**

### **4.2.1 Morphologie der TJ entlang des Nephrons**

Die Länge des interzellulären Spalts entlang der verschiedenen Nephronsegmente variierte erheblich. Dabei schien eine positive Korrelation zwischen der Länge des interzellulären Spalts und der parazellulären Transportleistung zu bestehen. Während Nephronsegmente mit bekannter hoher parazellulärer Transportleistung wie der beginnende PT und die TAL eine deutlich mäandrierende TJ aufwiesen, zeigte sich in parazellulär dichteren Abschnitten wie dem DCT oder dem CD ein geraderes TJ Muster (eigene Bilder siehe Abbildung 22 sowie (41) Supporting Information). Außerdem zeigen elektronenmikroskopische Untersuchungen in diesem Sinne für dichtere Epithelien wie z. B. den DCT außerdem eine höhere Anzahl von TJ Strängen (16).

Besondere Aufmerksamkeit erforderte das TJ Muster der dünnen Schleifen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen beschrieben bis zu vier verschiedene Epitheltypen der dünnen Schleifen (21). Dabei zeigte sich in den hier untersuchten Mäusen in der aTL das ebenfalls in der Literatur für die Ratte beschriebene Muster (75), welches dem der TAL sehr ähnelt. In den dTL der untersuchten Mäuse zeigte sich das in der Literatur für den oberen Abschnitt der dTL juxtamedullärer Nephrone beschriebene Muster in allen Abschnitten der dTL (75). Die deutlich stärker interdigitierenden, krausen TJ in den untersuchten Mäusen lassen auch in diesen Nephronsegmenten eine besondere Bedeutung des parazellulären Transportwegs vermuten.

## 4.2.2 Verteilung von Claudin 2, 10, 14, 16, 19 entlang des Nephrons

### 4.2.2.1 *Claudin 2*

Claudin 2 wurde in der Zellkultur als Kationen- und Wasserpermeable Pore charakterisiert. Wie Untersuchungen der Claudin 2 defizienten Maus zeigen, ist Claudin 2 in vivo insbesondere für die Reabsorption von Natrium und Wasser sowie in geringerem Maße auch für Kalzium verantwortlich (38). Die in den Mäusen beobachtete Expression von Claudin 2 deckte sich mit der in der Literatur beschriebenen, sowohl was die Nephronsegmente, als auch was die im PT von proximal nach distal zunehmende Ausdehnung der junctionalen Färbung angeht (27, 51). Eine Zuordnung der beginnenden dünnen Schleifen zu oberflächlichen oder juxtamedullären Nephronen erfolgte in den hier untersuchten Mäusen nicht.

### 4.2.2.2 *Claudin 10*

Die junctionale Expression von Claudin 10 war zuvor von verschiedenen Autoren mittels Antikörperfärbungen unterschiedlich beurteilt worden. Während die Gruppe um van Itallie Claudin 10 in allen Nephronsegmenten vorfand, konnte die Gruppe um Kiuchi-Saishin Claudin 10 lediglich im PT und der TAL finden (51, 81). Die junctionale Claudin 10 Expression in den hier untersuchten Mäusen glich eher der von Kiuchi-Saishin et al. beschriebenen, allerdings fand sich eine zusätzliche junctionale Färbung in den aTL (wie bereits durch van Itallie beschrieben).

Es ist davon auszugehen, dass es sich bei dem im PT gefundenen Claudin 10 um Claudin 10a handelt. Vorangegangene Untersuchungen finden in der Pars convoluta des PT ausschließlich Claudin 10a mRNA, jedoch keine Claudin 10b mRNA (36, 9). Aus dem murinen PT ist bekannt, dass die TJ zu Beginn eine Anionenselektivität aufweist und dass sich diese im weiteren Verlauf des PT in eine Kationenselektivität umkehrt (A. Kletz, unveröffentlichte Daten). Claudin 10a könnte dafür im PT die Anionenselektivität der TJ vermitteln (81).

Zur Expression von Claudin 10 in den TJ der dünnen Schleifen in der IM liegen bisher keine weiteren Untersuchungen vor. Das entsprechende Muster der TJ, zusammen mit der Färbung der TJ an den Übergängen der aTL in die TAL, deutet darauf hin, dass es sich ausschließlich um aTL handelte. Dass sich die TJ Färbung vom Scheitelpunkt der TL in beide Richtungen mit demselben Muster verfolgen lässt, ist gut mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Struktur des Epithels der TL in Einklang zu bringen, die zeigen, dass das Epithel der aTL bereits vor dem Scheitelpunkt der TL beginnt (21). Unter funktionellen Gesichtspunkten ist die aTL ein Nephronsegment mit hoher Permeabilität für Natrium sowie Chlorid (49). Da die Expression von Claudin 10b von kortikal nach medullär zunimmt (81) und wahrscheinlich ein Chloridkanal für die transzelluläre Permeabilität der aTL verantwortlich ist (59), könnte es sich bei dem in der aTL exprimierten Claudin 10 zur Vermittlung

einer entsprechenden Kationenselektivität um Claudin 10b handeln. Unabhängig der Isoform scheint Claudin 10 in der aTL auf Grund seiner ausgeprägten Expression einen wichtigen Beitrag zur parazellulären Permeabilität zu übernehmen.

Beim in der TAL exprimierten Claudin 10 handelt es sich um Claudin 10b, was sowohl die in isolierten TAL durchgeführte PCR als auch die Literatur bestätigten (9). Die funktionelle Rolle des Claudin 10 in der TAL ist bereits in Claudin 10 defizienten Mäusen untersucht worden, wobei auch die stark ausgeprägte intrazelluläre Färbung als spezifische Färbung charakterisiert wurde (9). Die intrazelluläre Färbung könnte einen Reservepool darstellen, der bei Bedarf in die TJ mobilisiert werden kann oder die Färbung unreifer, sich im Syntheseprozess befindlicher Claudine (27). In Bezug auf Claudin 10 erscheint es außerdem möglich, dass es sich bei dem intrazellulär gefärbten Anteil um die nicht membranständige Isoform des Claudin 10b handelt (36). Welche bzw. ob das intrazelluläre Claudin 10 funktionell eine Rolle spielt, z. B. als Reservepool, kann nicht beurteilt werden. Allerdings fallen in OSOM und Kortex durchschnittlich 23 % der Zellen durch ihre fehlende intrazelluläre Claudin 10 Färbung auf (siehe Tabelle 24). Neben einer homogenen Zellpopulation in unterschiedlichen Funktionszuständen, könnte dies auch auf eine heterogene Zellpopulation der murinen TAL hinweisen, wie sie als erstes anhand morphologischer Kriterien, wie Oberflächenbeschaffenheit und Zellform, in den TAL der Rattenniere beschrieben wurde (3). Die Autoren definierten dabei einen glatten (smooth; S-Zellen) und einen rauen (rough; R-Zellen) Zelltyp. Dabei soll der Anteil der S-Zellen von medullär nach kortikal abnehmen, während der Anteil der R-Zellen von medullär nach kortikal zunehmen soll. Die Anzahl intrazellulär Claudin 10 gefärbter Zellen in OSOM und Kortex lässt am ehesten vermuten, dass es sich bei diesen um die R-Zellpopulation handelt. Allerdings zeigen die weit medullär gelegenen TAL junctional eine ausgeprägte Claudin 10 Färbung, so dass dies nicht mit der ausschließlichen Claudin 10 Expression in R-Zellen in Einklang zu bringen ist. Andere Autoren versuchten die Zellpopulationen der TAL weiter zu charakterisieren. Sie fanden dabei verschiedene Eigenschaften wie eine heterogene Kaliumkanal (ROMK) Expression in den kortikalen TAL der Ratte, eine heterogene Kaliumleitfähigkeit in den TAL Zellen des Hamsters und eine heterogene Expression einer Isoform von NKCC2 in der murinen TAL (79, 87, 64). Eine Korrelation der Morphologie mit der Funktion erfolgte dabei nur in einem Fall und zeigte eine hohe apikale und niedrige basolaterale Kaliumleitfähigkeit der R-Zellen (79). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass auch andere Nagetiere als die Ratte eine funktionell relevante heterogene TAL Zellpopulation aufweisen könnten.

Das streifig-säulenartige Erscheinungsbild der intrazellulären Claudin 10 Färbung könnte durch die zahlreichen basalen Einfaltungen der TAL (12) bedingt sein. Die Einfaltungen der TAL nehmen jedoch von medullär nach kortikal ab (35), was in Bezug auf das Fehlen des streifig-säulenartigen Musters in

den TAL des ISOM widersprüchlich erscheint. Eventuell könnte sich das Fehlen des intrazellulären Färbungsmusters in den TAL des ISOM durch eine insgesamt geringer ausgeprägte intrazelluläre Färbung erklären. Die basalen Einfaltungen in den kortikalen R-Zellen des Hamsters sollen jedoch im Vergleich zu denen der kortikalen S-Zellen stärker ausgeprägt sein (79). Dies unterstützt wiederum die Hypothese, dass das intrazelluläre Färbungsmuster tatsächlich durch die basalen Einfaltungen bedingt sein kann und dass es sich bei den intrazellulär gefärbten Zellen um die R-Zellpopulation von OSOM und Kortex handelt.

#### 4.2.2.3 *Claudin 14*

In der TAL wurde die junctionale Expression von Claudin 14 bereits durch andere Untersuchungen gezeigt und durch Untersuchungen von Claudin 14 defizienten Mäusen funktionell charakterisiert (33). Wie in der Einleitung geschildert, zeigte sich dabei in Claudin 14 defizienten Mäusen unter erhöhter diätetischer Kalziumzufuhr eine unzureichende Abdichtung der TJ der TAL insbesondere gegenüber divalenten Kationen.

Allerdings wird in dieser Untersuchung (33) unter der normalen Diät mit 0,61 % Kalziumgehalt kein Claudin 14 in der TJ der TAL gefunden. Die, wenn auch gering ausgeprägte, junctionale Expression von Claudin 14 in den hier untersuchten Mäusen kann durch verschiedene Faktoren bedingt sein, z. B. dem geringfügig höheren Kalziumgehalt (0,9 %) der Kontrolldiät.

Der Nachweis einer Expression von Claudin 14 im Sammelrohr mit Hilfe von X-Gal Färbungen einer Mauslinie, deren Claudin 14 Gen durch lacZ unter Kontrolle des endogenen Claudin 14 Promotors ersetzt worden war, wurde von verschiedenen Autoren unterschiedlich beurteilt (6, 33). Unter Aktivierung des epithelialen Natriumkanals bildet das Sammelrohr ein lumen negatives transepitheliales Potential aus und stellt so die Triebkraft für eine parazelluläre Chloridreabsorption bereit (40). In der Zellkultur wird Claudin 14 in Abwesenheit von Claudin 16 und 19 als kationenbarrierebildendes Claudin charakterisiert (6, 22). Unter Aktivierung des epithelialen Natriumkanals im Sammelrohr könnte Claudin 14 somit einem parazellulären Verlust von Kationen ins Tubuluslumen entgegenwirken. Denkbar ist jedoch auch eine bisher unbekannte Interaktion von Claudin 14 mit einem der anderen im CD exprimierten Claudine und eine daraus resultierende spezifische Funktion. Letztlich kann auch eine unspezifische Färbung für die beobachtete Claudin 14 Färbung im CD verantwortlich sein.

#### 4.2.2.4 *Claudin 16*

Claudin 16 wurde in den untersuchten Mäusen hauptsächlich in den TJ der TAL des OSOM und des Kortex exprimiert. Die Literatur bestätigt die Expression von Claudin 16 in der TJ der TAL. Die



eigentliche Funktion von Claudin 16 wird bis heute, wie in der Einleitung geschildert, kontrovers diskutiert.

Verschiedene Autoren zeigten eine Expression von Claudin 16 zusätzlich auch in der aTL und dem DCT (Abbildung 7 und (53, 4)). In den untersuchten Mäusen konnten wenige Zellen mit junktionaler Färbung der aTL gefunden werden. Die aTL wurden anhand ihrer Lokalisation in der IM und morphologischer Kriterien identifiziert (75). Auf Grund der Eigenschaften des Claudin 16 erscheint die Vermittlung einer parazellulären Kationenpermeabilität durch dieses Claudin auch in den aTL wahrscheinlich.

Gong et al. zeigten für den isolierten DCT eine 20 mal niedrigere Claudin 16 mRNA Expression im Vergleich zur isolierten TAL (33). Für den DCT konnte dazu passend in den hier untersuchten Tieren keine Claudin 16 Färbung nachgewiesen werden.

#### 4.2.2.5 *Claudin 19*

Eine junktionale Claudin 19 Färbung fand sich, entgegen der Literatur, auch in den dTL der untersuchten Mäuse. Über die funktionellen Eigenschaften des Claudin 19 in diesen Nephronsegmenten lässt sich jedoch nur spekulieren. Claudin 19 könnte eine abdichtende Funktion einnehmen oder mit den ebenfalls dort exprimierten Claudinen 7 und 8 (58) interagieren und gegebenenfalls deren Funktion beeinflussen.

Auf Grund des Auftretens einzelner, Claudin 19 gefärbter TJ der aTL, der Ähnlichkeit zum Auftreten von Claudin 16 in diesem Nephronabschnitt sowie der bekannten Interaktion dieser Claudine in der aTL (4), erscheint in den aTL eine Koexpression von Claudin 16 und 19 auch in den hier untersuchten Mäusen wahrscheinlich. Claudin 19 könnte in den aTL, unter der Annahme der Koexpression mit Claudin 16, eine Kationenpermeabilität ähnlich der in der TAL vermitteln.

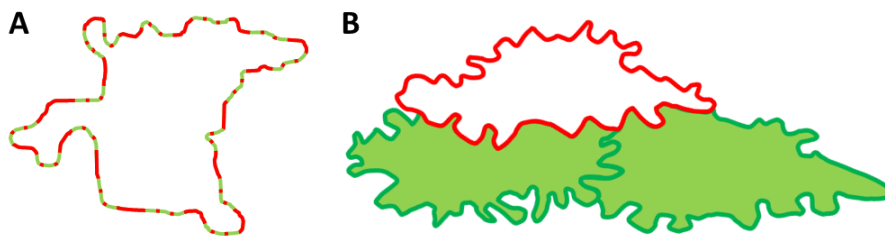
Bei der junktionalen Claudin 19 Expression in den TAL von OSOM und Kortex handelt es sich am wahrscheinlichsten um eine Kolo-kalisation mit Claudin 16. Dies lassen zum einen die jeweiligen Kofärbungen mit Claudin 10 vermuten, zum anderen wird dies auch in der Literatur bestätigt (4). Die funktionelle Rolle von Claudin 16 und Claudin 19 in der TAL wurde bereits in der Einleitung beschrieben. Die homogene, vesikuläre intrazelluläre Färbung in allen TAL Zellen des OSOM und Kortex steht in klarem Gegensatz zur intrazellulären Claudin 10 Färbung. Demnach scheinen alle Zellen dieses Nephronabschnitts Claudin 19 zu exprimieren, wobei die vesikuläre Struktur der intrazellulären Färbung an eine Funktion als Reservepool denken lässt.

Die Zusammensetzung der TJ der TAL in OSOM und Kortex scheint in Bezug auf die Beteiligung von Claudin 16, 19 und 14 sehr ähnlich zu sein. Auf Grundlage dieser morphologischen Daten liegt nahe, dass die TAL des OSOM, neben der cTAL (85), eine funktionell bedeutsame Rolle für die Kalzium- und Magnesiumreabsorption in der TAL spielt.

### 4.2.3 Claudindoppelfärbungen und junktionale Kolokalisationen

Die Funktion einer Claudinisoform muss immer im Zusammenhang mit den anderen in der TJ exprimierten Claudinen gesehen werden. Dies zeigte sich bisher wiederholt in Zellkulturuntersuchungen zur Funktion überexprimierter Claudine. Bei Überexpression desselben Claudins in Zellkulturen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der natürlicherweise exprimierten Claudine, ergaben sich dabei wiederholt widersprüchliche Ergebnisse (40). In diesem Zusammenhang können in einer TJ koexprimierte Claudine wichtige Hinweise für zukünftige funktionelle Betrachtungen liefern.

Eine Koexpression von Claudin 2 und 10a im PT zeigte sich lediglich punktuell. Interessanterweise fanden sich beide Claudine zum Teil abwechselnd in der TJ einer Zelle (Abbildung 30; schematisch Abbildung 38 A). Diese Beobachtung steht im extremen Gegensatz zur Beobachtung in der TAL. Claudin 10b und 16 zeigen in der TAL keine Koexpression (schematisch Abbildung 38 B).



**Abbildung 38** Schematische Zeldarstellung mit TJ Färbung **A** Proximale Tubuluszelle mit Claudin 2 und Claudin 10 gefärbter TJ **B** TAL Zellen mit Claudin 10 Färbung (grün) und Claudin 16 Färbung (rot). Rote Linien zeigen Claudin 16 gefärbte TJ. Hellgrüne Flächen zeigen intrazellulär Claudin 10 gefärbte Zellen. Dunkelgrüne Linien zeigen Claudin 10 gefärbte TJ.

Im Gegensatz zum Expressionsmuster von Claudin 2 und 10a im PT wechseln sich Claudin 10b und 16 innerhalb eines TJ Abschnitts in der TAL nicht ab. Eine Interaktion von Claudin 10b und Claudin 16 scheint in der TAL nicht möglich zu sein. Diese Beobachtung wird auch durch Zellkulturexperimente bestätigt, die für Claudin 10b lediglich die Fähigkeit zur homomeren und -typischen Interaktion erbrachte, während heteromere bzw. -typische Interaktionen mit den Claudinen 3, 11, 16 und 19 nicht beobachtet werden konnten (Milatz, unveröffentlichte Daten).

Erstaunlicherweise liegen bisher in Bezug auf diese strukturierte Anordnung der Claudine in den TJ der nativen renalen Tubulusepithelien weder unter dem alleinigen Aspekt der Anordnung noch unter funktionellen Gesichtspunkten weitere Erkenntnisse vor.

### 4.2.4 Effekte einer veränderten oralen Kalziumzufuhr

In den folgenden Kapiteln werden die Auswirkungen einer veränderten Kalziumzufuhr auf die Claudinexpression der TAL, die Kalziumhomöostase der Mäuse sowie kompensatorische Veränderungen in anderen Nephronabschnitten gemeinsam diskutiert. Dabei werden außerdem

funktionelle Daten der TAL dieser Mäuse erwähnt, die von A. Plain Reyes im Rahmen seiner Dissertation (66) in derselben Arbeitsgruppe erhoben wurden.

#### 4.2.4.1 *Auswirkungen der Kalziumdiäten auf den Organismus*

Die Mäuse der Niedrigkalziumdiätgruppe konnten ihre Plasmakalziumkonzentration konstant halten, was für eine physiologische Reaktion im Sinne einer PTH-Ausschüttung spricht. Diese zeigte sich außerdem, wie im Ergebnisteil erwähnt, in der auftretenden Phosphaturie und einer erhöhten FE Phosphat (52). Bei unveränderten Plasmanatriumkonzentrationen und identischen Natriumgehalten der verabreichten Diäten zeigte sich für die Niedrigkalziumdiättiere eine tendenziell gesteigerte Natriumexkretion, die möglicherweise auch auf die erhöhte PTH-Ausschüttung zurückzuführen ist. PTH hemmt im PT den Natrium-Protonen-Austauscher, der ein Natriumion in die Zelle hinein sowie ein Proton aus der Zelle herauspumpt (73). Dieses Proton wird zur Bikarbonatreabsorption benötigt. Eine im Falle der gesteigerten PTH-Ausschüttung verminderte luminale Protonenkonzentration hemmt indirekt die Bikarbonatreabsorption. Dies trägt dazu bei, eine metabolische Alkalose im Rahmen der PTH-Wirkung mit Auflösung von Knochensalzen zu verhindern (73).

Im Gegensatz dazu zeigte sich im Rahmen der Kalziumbelastung der Mäuse durch Verabreichung der Hochkalziumdiät eine reduzierte FE Phosphat. Diese Beobachtung macht eine reduzierte PTH-Freisetzung wahrscheinlich, die auch in einem Parallelexperiment bestätigt wurde (65) und in der Folge zu einer verminderten renalen Kalziumreabsorption führt (52). Im Rahmen der erhöhten oralen Kalziumzufuhr trugen mit Sicherheit auch andere regulatorische Vorgänge zur Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase bei. Angesichts des Alters der Versuchstiere von gut zwei Monaten, profitierten die Mäuse wahrscheinlich auch von einer gesteigerten Kalzitoninfreisetzung, die ihre hypokalzämische Wirkung insbesondere durch die Beeinflussung des Knochenstoffwechsels entfaltet (11).

In welchem Maße in beiden Fällen ein veränderter Kalzitriolstoffwechsel oder andere Faktoren zur Konstanthaltung der Plasmakalziumkonzentration beitrugen, kann nicht ausreichend beurteilt werden, wengleich die Veränderungen des Phosphathaushaltes eine führende Rolle der PTH-Freisetzung vermuten lassen. Mit Sicherheit stellte im Rahmen der Kalziumbelastung der Mäuse die direkte Wirkung des Kalziums auf den CaSR der TAL eine weitere wichtige regulatorische Komponente dar (siehe unten bzw. (33, 11)).

Die in der Hochkalziumdiätgruppe beobachtete tendenziell verminderte Urinosmolarität könnte im Rahmen einer gesteigerten Diurese als Folge der erhöhten Urinkalziumkonzentration entstanden sein. Bustamente et al. (13) zeigten, dass die Aktivierung des CaSR im Sammelrohr zu einer verminderten Expression von Aquaporin 2 führt. Die daraus resultierende reduzierte

Wasserreabsorption im CD führt zu einer verminderten Urinosmolarität und senkt bei gesteigerter Kalziurese die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Nephrolithiasis.

#### 4.2.4.2 *Expressionsanalysen der Kalziumdiättiere in Bezug auf die TAL*

Die in der PCR zur Detektion von Claudin 10a verwandten Primer detektieren von den sechs Varianten dieses Claudins sowohl Claudin 10a cDNA als auch dessen nicht membranständige Variante.

In der TAL wurde lediglich eine minimale, an der unteren Detektionsgrenze gelegene Claudin 10a mRNA Expression festgestellt. Diese Beobachtung zeigt in den verwandten Mäusen zum einen die in der Literatur angegebene Verteilung des Claudin 10a (9), zum anderen bestätigt die Abwesenheit des anionenspezifischen Claudin 10a zusammen mit der Expression der weiteren untersuchten Claudine die vorrangige Expression kationenselektiver Claudine in der TAL.

#### *Claudin 14 und funktionelle Daten*

Den stärksten Einfluss auf eine veränderte Reabsorption divalenter Kationen schien unter den untersuchten Claudinen in der TAL die gesteigerte Expression von Claudin 14 zu haben. Diese war auf Proteinebene in der TJ von Kortex und OSOM zu beobachten. Bedingt durch die Interaktion mit Claudin 16 resultiert die Abdichtung der TJ gegen divalente Kationen wie Kalzium und Magnesium (33). Die mRNA Expression von Claudin 14 war in der TAL von Tieren, die Hochkalziumdiät erhalten hatten tendenziell heraufreguliert, wobei eine erhebliche Streuung der Daten beobachtet wurde. Vorangegangene Untersuchungen zeigten eine statistisch signifikante Claudin 14 mRNA Expressionssteigerung unter Hochkalziumdiätbedingungen (33, 22). Diese ist nach den genannten Quellen auf eine Stimulation des in der TAL basolateral gelegenen CaSR zurückzuführen. Passend dazu findet Plain Reyes eine messbare Beeinflussung der tubulären Transportleistung unter einer Kalziumbelastung der Mäuse (66). Neben einem in der Hochkalziumdiätgruppe reduzierten transepithelialen Potential, als Triebkraft der parazellulären Reabsorption, findet sich in den untersuchten Mäusen eine im Vergleich zur Kontrolldiätgruppe verminderte Permeabilität der TJ für Magnesium und Kalzium (siehe Figure 16 und 17 aus (66)). In einer weiterführenden Studie (65) in der die Lokalisation der untersuchten TAL berücksichtigt wurde, konnte unsere Arbeitsgruppe inzwischen bestätigen, dass die Claudin 14 mRNA Expression in der kortikalen TAL durch erhöhte orale Kalziumzufuhr ansteigt. Die Hochkalziumdiät führte in der cTAL zu einer signifikant verminderten Permeabilität des parazellulären Weges für Kalzium und Magnesium. Im ISOM, welches nicht die Lokalisation der hauptsächlichen Kalzium- und Magnesiumreabsorption der TAL darstellt, führt jedoch wahrscheinlich die Aktivierung des basolateral gelegenen CaSR zu einer transzellulären Hemmung des Natriumchloridtransportes. Hieraus resultiert eine Minderung

der Konzentrierungsfähigkeit der Niere, welche ebenfalls zur gesteigerten Diurese der untersuchten Tiere beiträgt (65). Die ursprünglichen Daten zeigten demnach ein gemischtes Bild, da TAL sämtlicher Lokalisationen in die Daten eingingen.

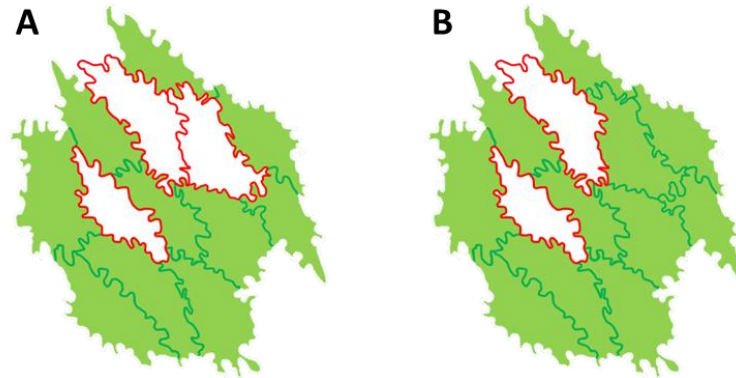
Bei erniedrigter oraler Kalziumzufuhr in den TAL junger weiblicher Mäuse kam es zu keiner messbaren Steigerung der Kalziumreabsorption gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Figure 17 aus (66)). Die Expression der Claudin 14 mRNA lag unter Niedrigkalziumdiätbedingungen in der TAL unterhalb der Detektionsgrenze, was auf eine weitere Reduktion der Claudin 14 Expression unter diesen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolldiät hinweisen könnte. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer vorangegangenen Untersuchung, in der eine Reduktion der Claudin 14 mRNA Expression um 63 % unter Niedrigkalziumdiätbedingungen im Vergleich zur Expression unter Kontrolldiätbedingungen ermittelt worden war (33). Bei entsprechender Translation könnte diese verringerte Expression die Reabsorption divalenter Kationen in der TAL begünstigen. Passend zu den funktionellen Daten von Plain Reyes, die keinen Einfluss auf die elektrophysiologischen Daten der TAL der Tiere zeigten, fand sich jedoch in den hier untersuchten Mäusen unter Niedrigkalziumdiätbedingungen in den TAL in OSOM und Kortex lediglich eine minimale Reduktion der Claudin 14 Proteinexpression gegenüber der bereits sehr geringen Expression in den Kontrolldiätmäusen. Über kurzfristige (Stunden bis wenige Tage) oder langfristige (mehrere Wochen) Anpassungen der Transportvorgänge in der TAL kann anhand der erhobenen Daten jedoch keine Aussage getroffen werden. Betrachtungen der langfristigen Regulation der Kalziumhomöostase beschränken sich meist auf den Knochenstoffwechsel (57).

#### *Claudin 16 und 19*

Neben der Expressionssteigerung von Claudin 14 wäre eine gesteigerte junktionale Expression von Claudin 10b oder eine reduzierte junktionale Expression der aus Claudin 16 und 19 bestehenden funktionellen Einheit in OSOM und Kortex zu erwarten, um bei erhöhter Kalziumzufuhr die Permeabilität des parazellulären Transportwegs für divalente Kationen zu reduzieren.

Für Claudin 16 und beide Varianten des murinen Claudin 19 konnten keine Transkriptionsunterschiede festgestellt werden. Dieses Untersuchungsergebnis bestätigte sich in den hier betrachteten Mäusen auch auf Proteinebene. Die unveränderte Anzahl intrazellulär Claudin 10 gefärbter Zellen in OSOM und Kortex deutet, unter Berücksichtigung des Expressionsmusters von Claudin 10 und Claudin 16 in der TAL (Kapitel 3.4.3 und Abbildung 39), auf ein unverändertes Expressionsverhältnis von Claudin 10 und Claudin 16 unter der Hochkalziumdiätbedingung hin, d. h. eine achttägige Diät mit vermehrtem Kalziumgehalt führte nicht zur Änderung im Verhältnis Claudin 10 und 16 exprimierender Zellen in der TAL, wie in Abbildung 39 B hypothetisiert. Dieses

Ergebnis widerspricht damit einer Zellkulturuntersuchung, die eine Internalisierung von Claudin 16 aus der TJ durch eine CaSR Aktivierung zeigte (48). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen vielmehr das von Gong et al. etablierte Konzept (33), das Claudin 14 als Regulator, der aus Claudin 16 und 19 bestehenden funktionellen Einheit, beschreibt.



**Abbildung 39** Schematische Darstellung des Epithels der TAL. Rote Linien zeigen Claudin 16 gefärbte TJ. Hellgrüne Flächen zeigen intrazellulär Claudin 10 gefärbte Zellen. Dunkelgrüne Linien zeigen Claudin 10 gefärbte TJ. **A** Epithel unter Kontrollbedingungen **B** Hypothetische, aber für vermehrte orale Kalziumzufuhr falsifizierte Änderung des Claudinbesatzes einer junktional Claudin 16 exprimierenden Zelle (aus A). Unter einem adäquaten Stimulus könnten weniger Zellen Claudin 16 exprimieren zugunsten einer gesteigerten Claudin 10 Expression.

Die unveränderte intrazelluläre Expression von Claudin 10 in der TAL unter der erhöhten Zufuhr von Kalzium macht außerdem das Vorliegen einer homogenen Zellpopulation in unterschiedlichen Funktionszuständen unwahrscheinlicher und unterstützt die Hypothese einer heterogenen Zellpopulation der TAL.

### *Claudin 10*

Auf Grund des Ergebnisses des WB lässt sich eine quantitative Steigerung der Claudin 10 Gesamtexpression in den TAL des OSOM und Kortex ausschließen.

Allerdings kam es unter der erhöhten Kalziumzufuhr im Vergleich zu den TAL der Kontrolldiättiere zu einer 1,5-fach erhöhten Claudin 10b mRNA Expression in den isolierten TAL, was bei entsprechend veränderter Translation eine gesteigerte Permeabilität für monovalente Kationen zur Folge haben könnte (9). Diese Beobachtung ist jedoch lediglich als Hinweis zu verstehen, da die Expression einer mRNA keinerlei Rückschlüsse auf die Translation der entsprechenden mRNA in ein funktionsfähiges Protein, posttranslationale Modifikationen und die letztliche Lokalisierung und Funktion des Proteins in der Zelle liefert (14). In den Immunfluoreszenzfärbungen fand sich eine quantitative Steigerung (siehe Kapitel 2.7.4) der junktionalen Claudin 10 Expression im Vergleich zu den Kontrolldiätieren sowohl in den TAL des ISOM von Hoch- als auch von Niedrigkalziumdiätieren und könnte in beiden Fällen einen kompensatorischen Mechanismus zur Reduktion eines Natriumverlusts darstellen.

Im Falle der Niedrigkalziumdiättiere könnte eine vermehrte Natriumreabsorption in der TAL einen ausgeprägten Natriumverlust durch die PTH-Wirkung im PT ausgleichen. Eine Gegenregulation der Hybernatriurie in aldosteronsensitiven Nephronabschnitten erscheint auf Grund der fehlenden Beeinflussung der Kaliumausscheidung unwahrscheinlich.

Die Aktivierung des CaSR der TAL unter der Kalziumbelastung der Mäuse führt nicht nur zu der oben diskutierten Expressionssteigerung von Claudin 14. Sie führt ebenfalls zur Hemmung von NKCC2 (73, 65), was wiederum die Reabsorption von Natrium und Chlorid in der TAL sowie die Triebkraft zur Reabsorption von Kationen reduziert. Die Mäuse zeigten eine verminderte Plasmachloridkonzentration, was zu diesem Effekt der CaSR Aktivierung passen könnte. In der Literatur wird für Hyperkalzämien neben dem Verlust von Chlorid ein renaler Natriumverlust beschrieben (45), der in diesem Versuch nicht beobachtet werden konnte. Dem Natriumverlust entgegenwirken könnte die beobachtete verstärkte junktionale Claudin 10 Expression in der TAL des ISOM.

#### 4.2.4.3 Befunde aus anderen Nephronabschnitten

##### *DCT*

Das Hauptziel kalziotropischer Hormone stellt der transzelluläre Kalziumtransport im DCT dar (55). Dies zeigt sich möglicherweise auch in der vermehrten junktionalen Expression von Claudin 19 insbesondere im DCT unter Niedrigkalziumdiätbedingungen sowie weniger stark ausgeprägt im kortikalen CD. Die aus Zellkulturexperimenten bekannte barrierebildende Funktion des Claudin 19 könnte bei gesteigertem transzellulären Transport von Kalzium und dementsprechend gesteigerten transepithelialen Konzentrationsunterschieden einem parazellulärem Rückfluss von Kalzium aus dem Interstitium ins Tubuluslumen entgegenwirken. Die Verbesserung der parazellulären Barriere in diesem Nephronabschnitt unter den Niedrigkalziumdiätbedingungen könnte für eine vorhandene parazelluläre Durchlässigkeit dieses Nephronsegments unter Kontrollbedingungen sprechen. Allerdings können weitere Funktionen des Claudin 19 nicht ausgeschlossen werden, da bislang keine Untersuchungen zur Funktion von Claudin 19 im DCT vorliegen.

Ein vermehrter transzellulärer Transport von Magnesium könnte im Rahmen der Hochkalziumdiät den Stimulus zur gesteigerten junktionalen Expression von Claudin 19 im DCT zur Abdichtung der TJ darstellen. Trotz aller regulatorischen Vorgänge fand sich in den Plasmaproben der Hochkalziumdiättiere eine, im Vergleich zu den Tieren der Kontrolldiät erhöhte Kalziumkonzentration und eine unauffällige Magnesiumkonzentration. Im Urin konnte eine gesteigerte Kalziurese, hingegen eine normale Magnesiumausscheidung beobachtet werden. Dies wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (8) und erscheint unter Berücksichtigung der engen Verzahnung von Kalzium- und Magnesiumhaushalt bemerkenswert. Insgesamt scheint der DCT eine gut ausgeprägte

Kompensationsfähigkeit zur Reabsorption von Magnesium aufzuweisen, was sich z. B. auch in der meist fehlenden Hypermagnesiurie beim Bartter Syndrom zeigt (71) und die unveränderte Magnesiurie der Hochkalziumdiättiere, trotz der Abdichtung der TAL gegen Kationen, erklären könnte. Der im DCT hauptsächlich für die transzelluläre Reabsorption von Magnesium verantwortliche Kanal TRPM6 wird u. a. über die luminale Magnesiumkonzentration reguliert. Eine erhöhte Magnesiumkonzentration im Urin führt so zu einer gesteigerten Magnesiumreabsorption im DCT (23).

#### *CD*

Eine RNA Expression von Claudin 14 wurde im CD der Mäuseniere bereits durch andere Untersuchungen gezeigt (6), wobei die mRNA Expression von Claudin 14 im isolierten CD nur 9 % der Claudin 14 mRNA Expression der isolierten TAL beträgt (33). Die beobachtete Claudin 14 Färbung in den TJ des CD sollte unter methodischen Gesichtspunkten durch andere Verfahren weiter untersucht werden, da die gesteigerte Expression von Claudin 14 in den TAL der untersuchten Diättiere stets mit einer verringerten Claudin 14 TJ Färbung in den CD der entsprechenden Diättiere einherging (Tabelle 31). Dies könnte als Hinweis auf eine unspezifische Antikörperbindung im CD gedeutet werden. Weitere Untersuchungen dazu wurden auf Grund der Fokussierung auf den parazellulären Kalzium-Magnesium-Transport, der nicht im CD lokalisiert ist, nicht angestrebt.

#### **4.2.5 Effekte einer veränderten oralen Magnesiumzufuhr**

Ähnlich dem Kapitel 4.2.4 wird in den folgenden Kapiteln die Auswirkungen einer veränderten Magnesiumzufuhr auf die Claudinexpression der TAL, den Elektrolythaushalt sowie die kompensatorische Beeinflussung anderer Nephronabschnitten gemeinsam diskutiert. Dabei werden erneut funktionelle Daten der TAL einbezogen, die von A. Plain Reyes im Rahmen seiner Dissertation (66) in derselben Arbeitsgruppe erhoben wurden. Auf die einzelnen Claudinfunktionen soll dabei zur Vermeidung von Wiederholungen verzichtet werden, weshalb teilweise Verweise auf vorangegangene Kapitel vorzufinden sind.

##### *4.2.5.1 Auswirkungen der Magnesiumdiäten auf den Organismus*

Erwartungsgemäß kam es bei den Tieren der Niedrig- und Hochmagnesiumdiäten zur Hypo- bzw. Hypermagnesiämie sowie zur erniedrigten bzw. erhöhten Ausscheidung von Magnesium im Urin. Die in der Literatur sowohl für Menschen, als auch für Mäuse (30) beschriebene sekundäre Hypokalzämie bei verminderter Plasmamagnesiumkonzentration konnte in den untersuchten Mäusen, die über acht Tage die Niedrigmagnesiumdiät erhalten hatten, nicht festgestellt werden. Allerdings zeigten die entsprechenden Tiere eine geringfügig, jedoch signifikant, verminderte Plasmakalziumkonzentration,



dessen Auftreten möglicherweise durch dieselben Mechanismen erklärt werden kann. Zur Entstehung einer sekundären Hypokalzämie gibt es verschiedene Erklärungsansätze, die die PTH-Antwort betreffen, die physiologischerweise unter verminderten Plasmamagnesiumkonzentrationen auftritt. Zum einen wird diskutiert, ob die PTH-abhängige Freisetzung von Knochensalzen durch die Hypomagnesiämie gestört wird (52, 30), wobei keine weiteren Erklärungen zu den beteiligten Mechanismen vorliegen. Zum anderen wird eine intrazellulär auftretende Magnesiumverarmung diskutiert, die die Freisetzungsmechanismen von PTH aus den Nebenschilddrüsen stört (30). Welche der Hypothesen zutrifft, kann nicht beurteilt werden, eine zeitliche Komponente scheint die Entstehung einer sekundären Hypokalzämie zu begünstigen. In einem Versuch, in dem Mäusen über einen Zeitraum von ein bis drei Tagen eine Niedrigmagnesiumdiät verabreicht worden war, konnten in diesem Zeitfenster keine Veränderungen der Plasmakalziumkonzentration beobachtet werden (25).

Im Gegensatz dazu führte die unter Magnesiumlast auftretende Hypermagnesiämie wahrscheinlich zur Hemmung der PTH-Sekretion durch die Aktivierung des CaSR der Nebenschilddrüsen und zu einer deutlich ausgeprägten Hypokalzämie. Diese Hypokalzämie, bei den etwa sechs Wochen alten, im Wachstum befindlichen Mäusen, kann eine Ursache der beobachteten Störung des Längenwachstums darstellen. Die verminderte PTH-Sekretion könnte in der Folge auch für eine vermehrte Phosphatreabsorption im PT ursächlich sein (78, 30), ähnlich der Reaktion der Hochkalziumdiättiere. Diese Beeinflussung des Phosphathaushalts kann die Ursache für die beobachtete stark reduzierte Phosphatausscheidung im Urin der Hochmagnesiumdiättiere darstellen. Trotz der unter der verabreichten Hochmagnesiumdiät aufgetretenen, am ehesten durch das Magnesium induzierten osmotisch bedingten weichen und sehr wasserreichen Stühle, lagen sowohl die Plasmanatrium- als auch die Plasmakaliumkonzentration der Mäuse im Normbereich. Der tendenziell im Vergleich zur Kontrolldiätgruppe leicht erhöhte Plasmakaliumkonzentration der Hochmagnesiumdiättiere könnte jedoch auf eine azidotische Stoffwechsellage der Tiere im Rahmen enteraler Bikarbonatverluste hindeuten (52). Bei tendenziell erniedrigten Urinosmolaritäten der Tiere schien im Rahmen der weichen und sehr wasserreichen Stühle außerdem kein signifikanter Flüssigkeitsverlust aufgetreten zu sein.

#### 4.2.5.2 *Expressionsanalysen der Magnesiumdiättiere in Bezug auf die TAL*

##### *TAL des OSOM und Kortex*

Laut Literatur führt eine Magnesiumverarmung zu einer gesteigerten Magnesiumreabsorption in der TAL (20, 86). Diese Beobachtung konnte in den hier untersuchten Tieren durch funktionelle Messungen der TAL nicht bestätigt werden (66). Es zeigte sich weder eine Steigerung der aktiven Transportleistung der TAL noch eine Veränderung der berechneten Permeabilitäten für divalente

Kationen. Ebenso konnten keine Veränderungen der Claudinexpression für Claudin 14, 16 und 19 sowie Claudin 10 in OSOM und Kortex beobachtet werden, wobei nach den Ergebnissen der Kalziumdiätmäuse v. a. die unveränderte Expression von Claudin 14 überrascht. Die verminderten Plasmakalzium- und Plasmamagnesiumkonzentrationen und in der Folge Urinkalzium- und Urinmagnesiumkonzentrationen sollten zu einer geringeren Aktivierung des CaSR in der TAL führen, was wiederum eine Reduktion der Claudin 14 Expression nach sich ziehen sollte, die letztlich die Reabsorption von Kationen in der TAL begünstigte (33). Bei den hier als Versuchstieren genutzten jungen, weiblichen Mäusen kommt es jedoch weder unter verringerter oraler Kalzium- (siehe auch Kapitel 4.2.4.2) noch unter verringerter oraler Magnesiumzufuhr zu einer Steigerung der Reabsorption divalenter Kationen in der TAL (66).

Die unter hoher Magnesiumlast zu beobachtende Hypermagnesiurie ist laut Literatur v. a. auf eine reduzierte Transportkapazität in der TAL zurückzuführen (20). Vergleichbar mit der direkten Wirkung von Kalzium in der TAL, könnte auch Magnesium eine direkte Wirkung auf den CaSR in der TAL ausüben, wenngleich die Aktivierung des CaSR durch Magnesium grundsätzlich geringer ausgeprägt ist als durch Kalzium (72). Tatsächlich konnte in den Immunfluoreszenzfärbungen unter der gesteigerten Magnesiumaufnahme eine deutlich gesteigerte junctionale Claudin 14 Expression in der TAL des OSOM und Kortex gefunden werden, obwohl die mRNA Expression lediglich eine tendenziell, jedoch keine signifikant gesteigerte Claudin 14 Expression im Vergleich zu den Kontrolldiättieren zeigte. Wie unter der Hochkalziumdiätbedingung diskutiert, dichtet die vermehrte Claudin 14 Expression die TJ durch die Interaktion mit Claudin 16 v. a. gegen divalente Kationen ab (33). Diese Abdichtung dient als Teil der regulatorischen Vorgänge zur Aufrechterhaltung der Magnesiumhomöostase und kann zumindest teilweise die erhöhte FE Magnesium erklären, wobei die weiteren an der Magnesiumreabsorption beteiligten Nephronsegmente ebenfalls beteiligt sein können. In den untersuchten Tieren zeigte sich außerdem das bekannte Phänomen der Hypermagnesiämie induzierten Hyperkalzurie (78). Verschiedene Autoren diskutieren den kompetitiven parazellulären Transport von Magnesium und Kalzium in der TAL, die Stimulation des CaSR der TAL, die Hemmung der PTH-Freisetzung sowie den kompetitiven transzellulären Transport von Magnesium und Kalzium im DCT als Ursachen für die Hypermagnesiämie induzierte Hyperkalzurie (78). Die unspezifische Abdichtung der TJ durch Claudin 14 in der TAL unter der Hochmagnesiumdiätbedingung könnte ebenfalls zur erhöhten FE Kalzium und Hyperkalzurie in den Mäusen beitragen. Als Grund für die fehlenden Veränderungen in den elektrophysiologischen Messungen (66) könnte die gemischte Untersuchung von cTAL und medullären TAL in Frage kommen.

Die anderen untersuchten Claudine, Claudin 10, 16 und 19, zeigten im OSOM und Kortex unter beiden Magnesiumdiäten keine veränderte Expression. Dies ist insbesondere in Bezug auf die Expression von Claudin 16 widersprüchlich, in einer anderen Untersuchung wurde nach einer dreitägigen Hochmagnesiumdiät eine verringerte junctionale Claudin 16 Expression in der TAL gezeigt sowie nach einer dreitägigen Niedrigmagnesiumdiät eine gesteigerte junctionale Claudin 16 Expression (25). Auch mit Magnesium als Stimulus lassen die erhobenen Daten, wie in Kapitel 4.2.4.2 geschildert, eine direkte Regulation von Claudin 16 unwahrscheinlich erscheinen und favorisieren die indirekte Regulation der funktionellen Claudin 16 und 19 Einheit durch Claudin 14 (33).

#### *TAL des ISOM*

Wie bereits unter Hoch- und Niedrigkalziumbedingungen beobachtet, zeigten auch die Mäuse unter Niedrig- und Hochmagnesiumdiätbedingungen eine quantitativ gesteigerte Claudin 10 Expression in der TAL des ISOM.

Unter Hochmagnesiumdiätbedingungen könnte, wie bereits unter der Hochkalziumdiätbedingung diskutiert (Kapitel 4.2.4.2), eine CaSR Aktivierung ursächlich für die Notwendigkeit einer kompensatorisch gesteigerten Natriumchloridreabsorption sein. Im Gegensatz zur Hochkalziumdiät kam es trotz der mutmaßlichen Hemmung des transzellulären Transports in der TAL unter der Hochmagnesiumdiät lediglich zu einer tendenziellen Verminderung der Plasmachloridkonzentration, dies könnte insbesondere unter Berücksichtigung der gesteigerten FE Chlorid durch den erhöhten Chloridanteil im Futter bedingt sein.

Die beobachtete, tendenziell gesteigerte FE Phosphat unter Niedrigmagnesiumdiätbedingungen könnte Ausdruck einer gesteigerten PTH-Freisetzung sein. Im PT reduziert diese die in der luminalen Plasmamembran lokalisierten Natrium-Phosphat-Kotransporter (7), was neben einer gesteigerten Phosphatausscheidung eine verminderte transzelluläre Reabsorption von Natrium zur Folge hat. Die gesteigerte Claudin 10 Expression könnte diesem Natriumverlust kompensatorisch entgegenzutreten.

#### *4.2.5.3 Befunde aus anderen Nephronabschnitten*

##### *PT*

Bisher existieren keine Daten zur Korrelation der Zusammensetzung der Claudine des PT mit der in der Einleitung geschilderten Funktionsweise des PT. Die reduzierte Expression von Claudin 10a im PT unter der Niedrigmagnesiumdiät könnte die Relation anionen- und kationenporenbildender Claudine im PT zugunsten der kationenporenbildenden Claudine verschieben und so eine verbesserte parazelluläre Permeabilität für divalente Kationen wie Kalzium und Magnesium generieren. Inwiefern Expressionsunterschiede kationenporenbildender Claudine die Permeabilität des PT unter der verminderten Magnesiumaufnahme verändern, wurde bisher nicht untersucht.

## *DCT*

Die junctionale Claudin 19 Expression zeigte sich im DCT auch unter Niedrig- und Hochmagnesiumbedingungen verändert.

Unter Niedrigmagnesiumdiätbedingungen kommt es, um eine Kalzium- und Magnesiumverarmung zu kompensieren, vermutlich zur Steigerung des transzellulären Transports im DCT (2, 24). In diesem Sinne könnte die vermehrte junctionale Expression von Claudin 19 im DCT, wie im DCT der Hochkalziumdiättiere, eine verbesserte Abdichtung des parazellulären Transportwegs, bei gesteigerten transepithelialen Kalzium- und Magnesiumgradienten bewirken, um dem parazellulären Rückfluss transzellulär reabsorbierter divalenter Kationen entgegenzuwirken.

Interessanterweise tritt unter einer gesteigerten oralen Kalziumzufuhr und einer gesteigerten junctionalen Claudin 14 Expression in der TAL kein gesteigerter Magnesiumverlust im Urin auf, was bereits in Kapitel 4.2.4.3 diskutiert wurde. Im Gegensatz dazu zeigen die Tiere der Hochmagnesiumdiätgruppe bei ebenfalls gesteigerter Claudin 14 Expression in den TJ der TAL eine Hyperkalzurie. Der DCT scheint eine reduzierte fröhutubuläre Kalziumreabsorption, z. B. in der TAL, grundsätzlich schlechter auszugleichen als eine reduzierte fröhutubuläre Magnesiumreabsorption. Im DCT erfolgt die transzelluläre Reabsorption von Kalzium hauptsächlich durch den epithelialen Kalziumkanal TRPV5, der insbesondere durch PTH reguliert wird (24). Da es unter der Hochmagnesiumdiät mutmaßlich zu einer Hemmung der PTH-Freisetzung kommt, kann auch der transzelluläre Kalziumtransport im DCT nicht gesteigert werden, um einer Hyperkalzurie entgegenzuwirken, vielmehr kommt es zu einem reduzierten Kalziumtransport. Passend zum reduzierten transepithelialen Kalziumtransport und der mutmaßlich abdichtenden Funktion des Claudin 19 (siehe Kapitel 4.2.4.3) zeigte sich in den DCT der Hochmagnesiumdiättiere eine im Vergleich zu den Tieren der Kontrolldiät reduzierte, lediglich punktuelle junctionale Expression von Claudin 19.

## 5. Zusammenfassung

Für den Transport von Salzen über Epithelien ist neben dem transzellulären der parazelluläre Transport entscheidend. Das anatomische Korrelat dieses Transportwegs bildet die Tight Junction, die aus einer Vielzahl verschiedener Proteine aufgebaut ist. Von diesen Proteinen sind insbesondere die Claudine für die Permeabilitätseigenschaften des parazellulären Transportwegs verantwortlich. Die verschiedenen Claudine unterscheiden sich in ihren biophysikalischen Eigenschaften und werden in den hochspezialisierten Epithelien des Nephrons segmentspezifisch exprimiert.

Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener Claudine zeigten in den einzelnen Nephronsegmenten unterschiedliche Formen des parazellulären Spalts. Dabei wurden in Nephronsegmenten mit besonderer Bedeutung des parazellulären Transports stark mäandrierende Tight Junction Muster beobachtet, während Nephronsegmente mit geringerer parazellulärer Transportleistung nahezu geradlinige Tight Junctions aufwiesen. Bemerkenswert war die Ausprägung der stark mäandrierenden Tight Junction der dünnen Henle-Schleifen in allen ihren Abschnitten, was auf die besondere parazelluläre Transportleistung dieses Nephronabschnitts hindeuten könnte.

Die Expression der Claudine 2, 10, 14, 16 und 19 wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht, dabei fanden sich, neben neuartigen Befunden, zum Teil Abweichungen zur vorhandenen Literatur. Bemerkenswert war insbesondere die weitläufige Expression von Claudin 10 in den Tight Junctions der dünnen aufsteigenden Henle-Schleifen und die starke intrazelluläre Claudin 10 Färbung in den dicken aufsteigenden Henle-Schleifen, die im Außenstreifen des äußeren Marks und dem Kortex nur in einem Teil der Zellen beobachtet werden konnte. Das Verhältnis der intrazellulär gefärbten und ungefärbten Zellen unterstützt die Hypothese des Vorhandenseins einer heterogenen Zellpopulation in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife.

Neben der alleinigen Expression eines Claudins in der Tight Junction, hängt die Funktion insbesondere von der Expression weiterer Claudine und deren Interaktion ab. Bemerkenswert war dabei die sich gegenseitig ausschließende Expression von Claudin 10b und Claudin 16 in den Tight Junctions der dicken aufsteigenden Henle-Schleife, die hier erstmals dokumentiert ist.

Dem parazellulären Transport entlang des Nephrons kommt insbesondere im Rahmen der Kalzium- und Magnesiumhomöostase eine wichtige Rolle zu. Veränderungen der Zusammensetzung der Tight Junctions wurden dabei in Mäusen untersucht, die über einen Zeitraum von acht Tagen Futter mit verschiedenen Kalzium- bzw. Magnesiumlasten erhielten. Weder unter Niedrigkalzium- noch unter Niedrigmagnesiumbedingungen konnte eine ausgeprägte Veränderung der Zusammensetzung der Tight Junction der dicken aufsteigenden Henle-Schleife beobachtet werden. Allerdings zeigte der proximale Tubulus unter der Niedrigmagnesiumdiät eine verringerte Expression des Anionenpermeabilität-vermittelnden Claudin 10a. Unter Hochkalziumdiät kam es zu einer aus der

Literatur bereits bekannten Expressionssteigerung des, die Tight Junction der dicken aufsteigenden Henle-Schleife abdichtenden Claudin 14. Diese trat auch unter der Hochmagnesiumdiät auf. Zusätzlich zeigte sich für die Tiere der Hochkalziumdiät eine gesteigerte Claudin 10b mRNA Expression, die zwar im Western Blot nicht als Proteinexpressionssteigerung der ganzen dicken aufsteigenden Henle-Schleife bestätigt werden konnte. Allerdings wiesen diese Tiere in den Immunfluoreszenzfärbungen eine vermehrte Claudin 10 Expression in den Tight Junctions der dicken aufsteigenden Henle-Schleife des Innenstreifens des äußeren Marks auf. Diese konnte geringer ausgeprägt auch unter anderen Diätbedingungen gefunden werden und könnte am ehesten einem aus verschiedenen Gründen auftretenden Natriumverlust entgegenwirken. Zusätzlich zu den Befunden in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife zeigte sich eine veränderte junctionale Claudin 19 Expression im distalen Konvolut. Claudin 19 scheint der Abdichtung des parazellulären Transportwegs dieses, an der Kalzium- und Magnesiumhomöostase beteiligten Tubulusabschnitts zu dienen. Die vorliegenden Daten zu Muster, Funktion und Regulation von Claudinen im Nierentubulus verdeutlichen die bisher weiterhin unterschätzte Rolle des parazellulären Transportwegs für die Homöostase des Salzhaushalts.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abuazza, G., Becker, A., Williams, S. S., Chakravarty, S., Truong, H. T., Lin, F., Baum, M. (2006): Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291(6), F1132-1141
2. Alexander, R. T., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J. (2008): Molecular determinants of magnesium homeostasis: insights from human disease. *J Am Soc Nephrol*, 19(8), 1451-1458
3. Allen, F., Tisher, C. C. (1976): Morphology of the ascending thick limb of Henle. *Kidney Int*, 9(1), 8-22
4. Angelow, S., El-Husseini, R., Kanzawa, S. A., Yu, A. S. (2007): Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(1), F166-177
5. Armbrecht, H. J., Wongsurawat, N., Paschal, R. E. (1987): Effect of age on renal responsiveness to parathyroid hormone and calcitonin in rats. *J Endocrinol*, 114(2), 173-178
6. Ben-Yosef, T., Belyantseva, I. A., Saunders, T. L., Hughes, E. D., Kawamoto, K., Van Itallie, C. M., Beyer, L. A., Halsey, K., Gardner, D. J., Wilcox, E. R., Rasmussen, J., Anderson, J. M., Dolan, D. F., Forge, A., Raphael, Y., Camper, S. A., Friedman, T. B. (2003): Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet*, 12(16), 2049-2061
7. Biber, J., Hernando, N., Forster, I., Murer, H. (2009): Regulation of phosphate transport in proximal tubules. *Pflugers Arch*, 458(1), 39-52
8. Bonny, O., Rubin, A., Huang, C. L., Frawley, W. H., Pak, C. Y., Moe, O. W. (2008): Mechanism of urinary calcium regulation by urinary magnesium and pH. *J Am Soc Nephrol*, 19(8), 1530-1537
9. Breiderhoff, T., Himmerkus, N., Stuiver, M., Mutig, K., Will, C., Meij, I. C., Bachmann, S., Bleich, M., Willnow, T. E., Muller, D. (2012): Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(35), 14241-14246
10. Bringhurst, F. R., Demay, M. B., Kronenberg, H. M. (2003): Hormones and disorders of mineral metabolism. In: Larsen, P. R., Kronenberg, H. M., Melmed, S., Polonsky, K. S. (Hrsg.), 10. Auflage. 1303-1371, W. B. Saunders, Philadelphia
11. Brown, E. M. (2013): Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27(3), 333-343
12. Bulger, R. E., Dobyan, D. C. (1982): Recent advances in renal morphology. *Annu Rev Physiol*, 44, 147-179
13. Bustamante, M., Hasler, U., Leroy, V., de Seigneux, S., Dimitrov, M., Mordasini, D., Rousselot, M., Martin, P. Y., Feraille, E. (2008): Calcium-sensing receptor attenuates AVP-induced aquaporin-2 expression via a calmodulin-dependent mechanism. *J Am Soc Nephrol*, 19(1), 109-116

14. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4), 611-622
15. Cikos, S., Bukovska, A., Koppel, J. (2007): Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol*, 8, 113
16. Claude, P., Goodenough, D. A. (1973): Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol*, 58(2), 390-400
17. Costanzo, L. S., Windhager, E. E. (1978): Calcium and sodium transport by the distal convoluted tubule of the rat. *Am J Physiol*, 235(5), F492-506
18. Cullen-McEwen, L. A., Kett, M. M., Dowling, J., Anderson, W. P., Bertram, J. F. (2003): Nephron number, renal function, and arterial pressure in aged GDNF heterozygous mice. *Hypertension*, 41(2), 335-340
19. De Rouffignac, C., Di Stefano, A., Wittner, M., Roinel, N., Elalouf, J. M. (1991): Consequences of differential effects of ADH and other peptide hormones on thick ascending limb of mammalian kidney. *Am J Physiol*, 260(6 Pt 2), R1023-1035
20. De Rouffignac, C., Quamme, G. (1994): Renal magnesium handling and its hormonal control. *Physiol Rev*, 74(2), 305-322
21. Dieterich, H. J., Barrett, J. M., Kriz, W., Bulhoff, J. P. (1975): The ultrastructure of the thin loop limbs of the mouse kidney. *Anat Embryol (Berl)*, 147(1), 1-18
22. Dimke, H., Desai, P., Borovac, J., Lau, A., Pan, W., Alexander, R. T. (2013): Activation of the Ca(2+)-sensing receptor increases renal claudin-14 expression and urinary Ca(2+) excretion. *Am J Physiol Renal Physiol*, 304(6), F761-769
23. Dimke, H., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J. (2010): Hereditary tubular transport disorders: implications for renal handling of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *Clin Sci (Lond)*, 118(1), 1-18
24. Dimke, H., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J. (2011): Molecular basis of epithelial Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport: insights from the TRP channel family. *J Physiol*, 589(Pt 7), 1535-1542
25. Efrati, E., Hirsch, A., Kladnitsky, O., Rozenfeld, J., Kaplan, M., Zinder, O., Zelikovic, I. (2010): Transcriptional regulation of the claudin-16 gene by Mg<sup>2+</sup> availability. *Cell Physiol Biochem*, 25(6), 705-714
26. Elkouby-Naor, L., Abassi, Z., Lagziel, A., Gow, A., Ben-Yosef, T. (2008): Double gene deletion reveals lack of cooperation between claudin 11 and claudin 14 tight junction proteins. *Cell Tissue Res*, 333(3), 427-438
27. Enck, A. H., Berger, U. V., Yu, A. S. (2001): Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281(5), F966-974
28. Feldman, G. J., Mullin, J. M., Ryan, M. P. (2005): Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(6), 883-917



29. Feraille, E., Doucet, A. (2001): Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev*, 81(1), 345-418
30. Ferre, S., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J. (2012): Sensing mechanisms involved in Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> homeostasis. *Kidney Int*, 82(11), 1157-1166
31. Friedman, P. A. (1999): Calcium transport in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 8(5), 589-595
32. Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K., Tsukita, S. (1998): Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 141(7), 1539-1550
33. Gong, Y., Renigunta, V., Himmerkus, N., Zhang, J., Renigunta, A., Bleich, M., Hou, J. (2012): Claudin-14 regulates renal Ca<sup>++</sup> transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway. *EMBO J*, 31(8), 1999-2012
34. Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., Jaramillo, B. E. (2003): Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 81(1), 1-44
35. Greger, R. (1985): Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev*, 65(3), 760-797
36. Günzel, D., Stuver, M., Kausalya, P. J., Haisch, L., Krug, S. M., Rosenthal, R., Meij, I. C., Hunziker, W., Fromm, M., Muller, D. (2009): Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci*, 122(Pt 10), 1507-1517
37. Günzel, D., Yu, A. S. (2009): Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 458(1), 77-88
38. Günzel, D., Yu, A. S. (2013): Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*, 93(2), 525-569
39. Hou, J., Paul, D. L., Goodenough, D. A. (2005): Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci*, 118(Pt 21), 5109-5118
40. Hou, J., Rajagopal, M., Yu, A. S. (2013): Claudins and the kidney. *Annu Rev Physiol*, 75, 479-501
41. Hou, J., Renigunta, A., Gomes, A. S., Hou, M., Paul, D. L., Waldegger, S., Goodenough, D. A. (2009): 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*, 106(36), 15350-15355
42. Hou, J., Renigunta, A., Konrad, M., Gomes, A. S., Schneeberger, E. E., Paul, D. L., Waldegger, S., Goodenough, D. A. (2008): Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest*, 118(2), 619-628
43. Hou, J., Renigunta, A., Yang, J., Waldegger, S. (2010): Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(42), 18010-18015

44. Hou, J., Shan, Q., Wang, T., Gomes, A. S., Yan, Q., Paul, D. L., Bleich, M., Goodenough, D. A. (2007): Transgenic RNAi depletion of claudin-16 and the renal handling of magnesium. *J Biol Chem*, 282(23), 17114-17122
45. Houillier, P., Nicolet-Barousse, L., Maruani, G., Paillard, M. (2003): What keeps serum calcium levels stable? *Joint Bone Spine*, 70(6), 407-413
46. Ikari, A., Hirai, N., Shiroma, M., Harada, H., Sakai, H., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., Takagi, K. (2004): Association of paracellin-1 with ZO-1 augments the reabsorption of divalent cations in renal epithelial cells. *J Biol Chem*, 279(52), 54826-54832
47. Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., Miwa, M. (2006): Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci*, 119(Pt 9), 1781-1789
48. Ikari, A., Okude, C., Sawada, H., Sasaki, Y., Yamazaki, Y., Sugatani, J., Degawa, M., Miwa, M. (2008): Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport via claudin-16. *Biochim Biophys Acta*, 1778(1), 283-290
49. Imai, M., Taniguchi, J., Tabei, K. (1987): Function of thin loops of Henle. *Kidney Int*, 31(2), 565-579
50. Kausalya, P. J., Amasheh, S., Günzel, D., Wurps, H., Muller, D., Fromm, M., Hunziker, W. (2006): Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg<sup>2+</sup> transport function of Claudin-16. *J Clin Invest*, 116(4), 878-891
51. Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y., Tsukita, S. (2002): Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol*, 13(4), 875-886
52. Klinke, R., Pape, H.-C., Silbernagl, S. (2005): *Physiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG
53. Konrad, M., Schaller, A., Seelow, D., Pandey, A. V., Waldegger, S., Lesslauer, A., Vitzthum, H., Suzuki, Y., Luk, J. M., Becker, C., Schlingmann, K. P., Schmid, M., Rodriguez-Soriano, J., Ariceta, G., Cano, F., Enriquez, R., Juppner, H., Bakaloglu, S. A., Hediger, M. A., Gallati, S., Neuhaus, S. C., Nurnberg, P., Weber, S. (2006): 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*, 79(5), 949-957
54. Krug, S. M., Günzel, D., Conrad, M. P., Rosenthal, R., Fromm, A., Amasheh, S., Schulzke, J. D., Fromm, M. (2012): Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell Mol Life Sci*, 69(16), 2765-2778
55. Lambers, T. T., Bindels, R. J., Hoenderop, J. G. (2006): Coordinated control of renal Ca<sup>2+</sup> handling. *Kidney Int*, 69(4), 650-654
56. Lassiter, W. C., Gottschalk, C. W., Mylle, M. (1963): Micropuncture study of renal tubular reabsorption of calcium in normal rodents. *American Journal of Physiology*, 204, 771-775

57. Lee, G. S., Byun, H. S., Kim, M. H., Lee, B. M., Ko, S. H., Jung, E. M., Gwak, K. S., Choi, I. G., Kang, H. Y., Jo, H. J., Lee, H. J., Jeung, E. B. (2008): The beneficial effect of the sap of *Acer mono* in an animal with low-calcium diet-induced osteoporosis-like symptoms. *Br J Nutr*, 100(5), 1011-1018
58. Li, W. Y., Huey, C. L., Yu, A. S. (2004): Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286(6), F1063-1071
59. Liu, W., Morimoto, T., Kondo, Y., Iinuma, K., Uchida, S., Sasaki, S., Marumo, F., Imai, M. (2002): Analysis of NaCl transport in thin ascending limb of Henle's loop in CLC-K1 null mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282(3), F451-457
60. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408
61. Ludbrook, J. (1998): Multiple comparison procedures updated. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 25(12), 1032-1037
62. Milatz, S., Krug, S. M., Rosenthal, R., Günzel, D., Müller, D., Schulzke, J. D., Amasheh, S., Fromm, M. (2010): Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta*, 1798(11), 2048-2057
63. Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., Tsukita, S. (2011): Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*, 585(4), 606-612
64. Mount, D. B., Baekgaard, A., Hall, A. E., Plata, C., Xu, J., Beier, D. R., Gamba, G., Hebert, S. C. (1999): Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL I. Molecular characterization and intrarenal localization. *Am J Physiol*, 276(3 Pt 2), F347-358
65. Plain, A., Wulfmeyer, V. C., Milatz, S., Klietz, A., Hou, J., Bleich, M., Himmerkus, N. (2016): Corticomedullary difference in the effects of dietary Ca(2+) on tight junction properties in thick ascending limbs of Henle's loop. *Pflugers Arch*, 468(2), 293-303
66. Plain Reyes, A. (2015): Regulation of the tight junction permeabilities in the TAL. Math.-Nat. Diss., Kiel
67. Quamme, G. A. (1980): Effect of calcitonin on calcium and magnesium transport in rat nephron. *Am J Physiol*, 238(6), E573-578
68. Quamme, G. A. (1989): Control of magnesium transport in the thick ascending limb. *Am J Physiol*, 256(2 Pt 2), F197-210
69. Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Wittwer, C. T. (1997): Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 245(2), 154-160
70. Rocha, A. S., Magaldi, J. B., Kokko, J. P. (1977): Calcium and phosphate transport in isolated segments of rabbit Henle's loop. *J Clin Invest*, 59(5), 975-983
71. Rodriguez-Soriano, J. (1998): Bartter and related syndromes: the puzzle is almost solved. *Pediatr Nephrol*, 12(4), 315-327

72. Rude, R. K., Gruber, H. E., Norton, H. J., Wei, L. Y., Frausto, A., Kilburn, J. (2006): Reduction of dietary magnesium by only 50% in the rat disrupts bone and mineral metabolism. *Osteoporos Int*, 17(7), 1022-1032
73. Schmidt, R. F., Lang, F. (2007): *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Heidelberg, Springer Medizin Verlag
74. Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008): Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nat Protoc*, 3(6), 1101-1108
75. Schwartz, M. M., Venkatachalam, M. A. (1974): Structural differences in thin limbs of Henle: physiological implications. *Kidney Int*, 6(4), 193-208
76. Shan, Q., Himmerkus, N., Hou, J., Goodenough, D. A., Bleich, M. (2009): Insights into driving forces and paracellular permeability from claudin-16 knockdown mouse. *Ann N Y Acad Sci*, 1165, 148-151
77. Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S., Lifton, R. P. (1999): Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science*, 285(5424), 103-106
78. Thumfart, J., Jung, S., Amasheh, S., Kramer, S., Peters, H., Sommer, K., Biber, J., Murer, H., Meij, I., Querfeld, U., Wagner, C. A., Müller, D. (2008): Magnesium stimulates renal phosphate reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295(4), F1126-1133
79. Tsuruoka, S., Koseki, C., Muto, S., Tabei, K., Imai, M. (1994): Axial heterogeneity of potassium transport across hamster thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol*, 267(1 Pt 2), F121-129
80. van de Graaf, S. F., Bindels, R. J., Hoenderop, J. G. (2007): Physiology of epithelial Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> transport. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 158, 77-160
81. Van Itallie, C. M., Rogan, S., Yu, A., Vidal, L. S., Holmes, J., Anderson, J. M. (2006): Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291(6), F1288-1299
82. Waters, J. C. (2009): Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *J Cell Biol*, 185(7), 1135-1148
83. Will, C., Breiderhoff, T., Thumfart, J., Stuver, M., Kopplin, K., Sommer, K., Günzel, D., Querfeld, U., Meij, I. C., Shan, Q., Bleich, M., Willnow, T. E., Müller, D. (2010): Targeted deletion of murine Cldn16 identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> wasting. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298(5), F1152-1161
84. Wittner, M., Desfleurs, E., Pajaud, S., Moine, G., Simeone, S., de Rouffignac, C., Di Stefano, A. (1997): Calcium and magnesium transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop: influence of age and gender. *Pflugers Arch*, 434(4), 451-456
85. Wittner, M., Di Stefano, A., Wangemann, P., Nitschke, R., Greger, R., Bailly, C., Amiel, C., Roinel, N., de Rouffignac, C. (1988): Differential effects of ADH on sodium, chloride, potassium,

calcium and magnesium transport in cortical and medullary thick ascending limbs of mouse nephron. *Pflugers Arch*, 412(5), 516-523

86. Wittner, M., Jounier, S., Deschenes, G., de Rouffignac, C., Di Stefano, A. (2000): Cellular adaptation of the mouse cortical thick ascending limb of Henle's loop (CTAL) to dietary magnesium restriction: enhanced transepithelial Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> transport. *Pflugers Arch*, 439(6), 765-771

87. Xu, J. Z., Hall, A. E., Peterson, L. N., Bienkowski, M. J., Eessalu, T. E., Hebert, S. C. (1997): Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *Am J Physiol*, 273(5 Pt 2), F739-748

88. Zhai, X. Y., Thomsen, J. S., Birn, H., Kristoffersen, I. B., Andreasen, A., Christensen, E. I. (2006): Three-dimensional reconstruction of the mouse nephron. *J Am Soc Nephrol*, 17(1), 77-88

## 7. Anhang

### 7.1 Zusammensetzung des Futters

#### ssniff® EF R/M Kontrolle Experimentalfuttermittel für Ratten und Mäuse



##### Beschreibung

Dieses Futtermittel basiert auf hoch gereinigten Ausgangserzeugnissen (purified diet) und ist daher für Studien vorgesehen, die eine besonders genaue Einstellung der Nährstoffkonzentrationen erfordern; dabei weist die Experimentaldiät eine hohe Nährstoffverfügbarkeit auf, sodass der Bedarf von Ratten und Mäusen im Erhaltungsstoffwechsel sowie im Wachstum in vollem Umfang gedeckt wird. Diese Futtermischung dient zugleich als Basis für nahezu sämtliche gereinigten bzw. halb-synthetischen ssniff® Diäten.

Rohnährstoffe	[%]	Energie	[MJ/kg]
Trockensubstanz	95,2	Bruttoenergie (GE)	18,0
Rohprotein (N x 6,25)	20,8	Umsetzbare Energie (ME)	15,4 <sup>1)</sup>
Rohfett	4,2		
Rohfaser	5,0		
Rohasche	5,6		
N-freie Extraktstoffe	59,4		
Stärke	46,8		
Zucker	10,8		

15,4<sup>1)</sup>



15,0<sup>2)</sup>



<sup>1)</sup> Berechnungsgrundlage: Schätzformel für Schweine nach Anlage 4 der FMV

<sup>2)</sup> Berechnet mit Atzwater-Faktoren

Mineralstoffe	[%]	Aminosäuren	[%]	Vitamine	per kg
Calcium	0,90	Lysin	1,71	Vitamin A	15.000 IE
Phosphor	0,63	Methionin	0,73	Vitamin D <sub>3</sub>	1.500 IE
Natrium	0,19	Met+Cys	0,82	Vitamin E	150 mg
Magnesium	0,21	Threonin	0,93	Vitamin K (als Menadion)	20 mg
Kalium	0,97	Tryptophan	0,27	Vitamin C	30 mg
		Arginin	0,76	Thiamin (B <sub>1</sub> )	16 mg
<b>Fettsäuren</b>	<b>[%]</b>	Histidin	0,66	Riboflavin (B <sub>2</sub> )	16 mg
C 8:0	---	Valin	1,42	Pyridoxin (B <sub>6</sub> )	18 mg
C 10:0	---	Isoleucin	1,09	Cobalamin (B <sub>12</sub> )	30 µg
C 12:0	---	Leucin	2,05	Nicotinsäure	49 mg
C 14:0	0,02	Phenylalanin	1,11	Pantothensäure	56 mg
C 16:0	0,45	Phe+Tyr	2,22	Folsäure	19 mg
C 16:1	0,02	Glycin	0,43	Biotin	310 µg
C 18:0	0,19	Glutaminsäure	4,69	Cholin-Cl	1.040 mg
C 18:1	1,07	Asparaginsäure	1,55	Inositol	80 mg
C 18:2	2,12	Prolin	2,39		
C 18:3	0,26	Alanin	0,68	<b>Spurenelemente</b>	<b>per kg</b>
C 20:0	0,02	Serin	1,24	Eisen	166 mg
C 20:1	---			Mangan	98 mg
C 20:5	---			Zink	65 mg
C 22:6	---			Kupfer	14 mg
				Iod	1,2 mg
				Selen	0,14 mg
				Cobalt	0,15 mg

Abbildung 40 Genaue Zusammensetzung der verwandten Kontrolldiät

### 7.2 Tierversuchsantrag

Die Tierversuche wurden beim Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume (MELUR) des Landes Schleswig-Holstein angezeigt und unter der Nummer V 312-7224.121-2 genehmigt.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinen Doktoreltern, Herrn Professor Dr. med. Markus Bleich und Frau Dr. med. Nina Himmerkus, für die Überlassung des Themas, die umfassende, geduldige Betreuung sowie den fördernden, jederzeit verfügbaren, fachlichen und persönlichen Rat.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Susanne Milatz für die Hilfestellung in fachlichen Belangen und die persönlichen aufmunternden Ratschläge während des Verfassens meiner Dissertation.

Ebenso danke ich den weiteren wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Angehörigen der AG Bleich sowie den beteiligten Mitarbeitern des physiologischen Instituts.

Im Privaten danke ich an erster Stelle meinen Eltern, Martina und Volker, für ihre emotionale Unterstützung sowie allen meinen Eltern für ihre finanzielle Unterstützung zur Realisierung dieser Arbeit als wichtiger Stufe meiner beruflichen und persönlichen Entwicklung.

Des Weiteren gilt mein Dank an dieser Stelle meinen Freundinnen und Freunden, Geschwistern sowie Mitbewohnerinnen und -bewohnern für ihr Verständnis, ihre Nachsicht und Diskussionsfreude u. a. als fruchtbringende, bereichernde, nächtliche Statistikdiskussion in der Küche.

Zu guter Letzt danke ich den Verfasserinnen und Verfassern der zahlreichen hilfreichen und kritischen Anmerkungen hinsichtlich formaler Kriterien.

## Lebenslauf

Name Vera Christine Wulfmeyer  
Geburtsdatum 27. März 1987  
Geburtsort Mannheim-Neckarau  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Schulbildung

1993-1997 Grundschule  
1997-2006 Wildermuth-Gymnasium, Tübingen  
Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife am 23. Juni 2006  
2006-2007 Absolvierung eines Freiwilligen Sozialen Jahres

### Studium

10/2007-05/2014 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
02/2013-01/2014 Praktisches Jahr  
Innere Medizin, Westküstenklinikum Heide  
Chirurgie, Städtisches Krankenhaus Kiel  
Radiologie, Strahlentherapie, Nuklearmedizin, Klinik für Radiologie und Neuroradiologie, Klinik für Radioonkologie und Klinik für Nuklearmedizin, Molekulare Bild Diagnostik und Therapie des UKSH Campus Kiel

### Promotion

seit 02/2012 Promotionsstudentin am Physiologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, AG Bleich  
03/2012-09/2012 Freisemester zur Durchführung experimenteller Arbeiten im Rahmen der Doktorarbeit

### Beruflicher Werdegang

seit 07/2015 Assistenzärztin in der Inneren Medizin

### Veröffentlichungen

Plain, A., Wulfmeyer, V. C., Milatz, S., Kliez, A., Hou, J., Bleich, M., Himmerkus, N. (2016): Corticomedullary difference in the effects of dietary Ca(2+) on tight junction properties in thick ascending limbs of Henle's loop. Pflugers Arch, 468(2), 293-303



### *Poster*

Milatz, S., Piontek, J., Wulfmeyer, V. C., Himmerkus, N., Bleich, M., Fromm, M., Günzel, D. (2015): Analysis of renal claudin interaction. *Acta Physiologica* 2015, Volume 213, Supplement 699:P185

Klietz, A., Himmerkus, N., Grüssel, S., Wulfmeyer, V. C., Bleich, M. (2014): Paracellular pathway properties of primary cultured in comparison to freshly isolated proximal tubules. *Acta Physiologica* 2014, Volume 210, Supplement 695:P279

Wulfmeyer, V. C., Himmerkus, N., Hou, J., Plain, A., Bleich, M. (2013): Segment specific tight junction pattern along the nephron. *Acta Physiologica* 2013; Volume 207, Supplement 694:P149

Plain, A., Himmerkus, N., Wulfmeyer, V. C., Bleich, M. (2012): Effect of Ca<sup>2+</sup> and phosphate intake on TAL tight junction permeability. 44<sup>th</sup> Meeting on Membrane Transport, Sandbjerg, Dänemark, Mai 2012.

### *Vorträge*

Allein, P., Wulfmeyer, V. C., Hou, J., Himmerkus, N., Bleich, M. (2013): The influence of calcium intake on paracellular permeability and claudin expression in the thick ascending limb. *Acta Physiologica* 2013; Volume 207, Supplement 694:O45

Wulfmeyer, V. C., Grüssel, S., Plain, A., Himmerkus, N., Bleich, M. (2012): Claudine in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife. 17. Treffen der Ostseephysiologen, Rostock, Mai 2012.