

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

**OSMOREGULATION VON TRANS- UND
PARAZELLULÄREM TRANSPORT IN PRIMÄR
KULTIVIERTEN ZELLEN DES INNERMEDULLÄREN
SAMMELROHRS DER RATTENNIERE**

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

vorgelegt von
ANNALISA KATHARINA ZIEMENS geb. Krause
aus **München**

Kiel 2018

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. Markus Bleich, Physiologisches Institut*
2. Berichterstatter: *Prof. Dr. Anna Trauzold, Institut für Experimentelle
Tumorforschung*
Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2018
Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	6
1.1 Die Niere	6
1.1.1 Aufbau und Funktion.....	6
1.1.2 Tight Junctions	10
1.1.3 Claudine.....	11
1.1.3.1 Claudin 8	12
1.1.3.2 Claudin 19	13
1.1.3.3 Claudin 10	13
1.1.4 Das Sammelrohr.....	13
1.1.5 Mechanismen der Harnkonzentrierung	15
1.2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Chemikalien.....	18
2.2 Experimentallösungen	18
2.3 Präparation der IMCD-Zellen	19
2.3.1 Versuchstiere	19
2.3.2 Präparation Nierenmedulla.....	19
2.3.3 Enzymlösung	20
2.3.4 Gewebeverdau	20
2.4 Zellkultur	20
2.4.1 Kulturfläche.....	20
2.4.2 Zellkulturmedium.....	21
2.4.3 Kultivierung.....	21
2.5 Ussing Kammer Versuche.....	22
2.5.1 Konstruktion der Kammer	22
2.5.2 Grundlage der Messtechnik.....	23
2.5.3 Versuchsdurchführung	24
2.5.4 Permeabilitäten.....	26
2.5.5 Liquid Junction Potentiale.....	26
2.5.6 Berechnung der Permeabilitäten für Natrium und Chlorid	28
2.6 Elektrolytmessungen	29
2.7 Immunfluoreszenz	29
2.7.1 Fixierung	29
2.7.2 Färbung der Filter und Nierenschnitte.....	30
2.7.3 Auswertung	31
2.8 FITC-Dextran-Messungen.....	32

2.8.1	Dialyse.....	32
2.8.2	Versuchsdurchführung	33
2.8.3	Dextran Permeabilität.....	33
2.9	Statistische Datenanalyse	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Einfluss der Osmolalität des Kulturmediums auf die Größe und Morphologie der Zellen... 35	35
3.2	Transepithelialer Widerstand der IMCD-Filterkulturen im Verlauf der Zellkultur	35
3.3	Elektrophysiologische Eigenschaften der IMCD-Filter-Zellen.....	36
3.4	FITC-Dextran Dichtigkeit der IMCD-Zellen	40
3.5	Elektrolytverschiebungen zwischen lumenalem und basolateralem Kompartiment.....	41
3.6	Histomorphologische Verteilungsmuster in IMCD-Filterkulturen und Nierenschnitten	43
3.6.1	ZO-1	43
3.6.2	Claudin 19 in IMCD-Filterkulturen und parallel gefärbten Nierenschnitten	43
3.6.3	Claudin 8	45
3.6.4	AQP2 und Claudin 10	46
4	Diskussion	49
4.1.	Methodendiskussion.....	49
4.1.1	Aussagekraft der primären IMCD-Zellkultur.....	49
4.1.2	Reinheit der IMCD-Kultur	49
4.1.3	Anwendungsseite der Osmolalität.....	50
4.2	Ergebnisdiskussion.....	50
4.2.1	Osmosensing	51
4.2.2	Regulation des parazellulären Weges.....	51
4.2.3	Physiologische Einordnung und These der Umprogrammierung.....	52
4.2.4	Bedeutung der dünnen Schleifen für die Ergebnisse.....	53
4.2.4.1	Dünne Schleifen als Leck.....	53
4.2.4.2	Dünne Schleifen als Claudin10b-abhängige kationenselektive Zellen	54
5	Zusammenfassung.....	55
6	Literaturverzeichnis.....	57
7	Anhang	62
7.2	Tierversuchsantrag	62
	Danksagung.....	62

Abkürzungsverzeichnis

300-IMCD-Zellen	bei 300 mosm/kg kultivierte Zellen des Sammelrohrs der inneren Medulla
600-IMCD-Zellen	bei 600 mosm/kg kultivierte Zellen des Sammelrohrs der inneren Medulla
900-IMCD-Zellen	bei 900 mosm/kg kultivierte Zellen des Sammelrohrs der inneren Medulla
ADH	Antidiuretisches Hormon
AE-1	<i>engl.: anion exchanger 1</i> , = Anionenaustauscher
ANOVA	<i>engl.: analysis of variance</i> , Varianzanalyse
AQP	Aquaporin, = Wasserkanal
BSA	bovines Serumalbumin
CCD	<i>engl.: cortical collecting duct</i> , = kortikales Sammelrohr
CD	<i>engl.: collecting duct</i> , = Sammelrohr
CNT	<i>engl.: connecting tubule</i> , = Verbindungstubulus
DCT	<i>engl.: distal convoluted tubule</i> , = Distaler Tubulus, Pars convoluta
DMEM	<i>engl.: dulbecco's modified eagles medium</i> , = Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ENaC	epithelialer Natriumkanal
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
GLOM	<i>engl.: glomerulus</i> , = Nierenkörperchen, Glomerulum
IMCD	<i>engl.: inner medullary collecting duct</i> , = Sammelrohr der inneren Medulla
LJP	<i>engl.: liquid junction potential</i>
NEA	<i>engl.: non essential amino acids</i> , = nicht essentielle Aminosäuren
OMCD	<i>engl.: outer medullary collecting duct</i> , = Sammelrohr der äußeren Medulla
PBS	<i>engl.: phosphat buffered saline</i> , phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	<i>engl.: phosphat buffered saline & triton</i>
PCT	<i>engl.: proximal convoluted tubule</i> , = Proximaler Tubulus, Pars convoluta
PFA	Paraformaldehyd
PST	<i>engl.: proximal straight tubule</i> , = Proximaler Tubulus, Pars recta
RFU	<i>engl.: relative fluorescence unit</i>
TAL	<i>engl.: thick ascending limb</i> , = dicke aufsteigende Henle-Schleife
te	transepithelial
TJ	<i>engl.: tight junction</i> , = Schlussleisten Zell-Zell-Kontakt
TL	<i>engl.: thin limb</i> , = dünne Schleife als Teil der Henle Schleife
ZO-1, -2, -3	Zonula occludens Proteine-1, -2, -3, die die TJ am Zytoskelett veranker

1. Einleitung

1.1 Die Niere

Die Physiologie der Niere als zentrales Ausscheidungsorgan harnpflichtiger Substanzen ist für die nachfolgend beschriebenen Methoden und Experimente von entscheidender Bedeutung. Die hier relevanten Grundlagen der zellphysiologischen Vorgänge sowie die mikroskopische Anatomie werden deshalb im Folgenden kurz beschrieben.

1.1.1 Aufbau und Funktion

Makroskopisch kann man die Niere in Rinde (*lat. Cortex*) und Mark (*lat. Medulla*) aufteilen, Abbildung 1a). Das Mark wiederum bildet sogenannte Markpyramiden, die im Nierenbeckenkelchsystem münden. Von hier aus leitet der Harnleiter den Harn zur Harnblase ab. Die menschliche Niere besitzt mehrere Markpyramiden, die der Ratte besteht aus einer einzelnen Markpyramide mit umgebender Rinde [41].

Die kleinste Funktionseinheit der Niere ist das Nephron. Es besteht aus einer Aneinanderreihung hoch funktionaler epithelialer Tubuli (Abbildung 1b).

Das arterielle Blut fließt durch zuführende Arterien in das Nierenkörperchen (*lat. Glomerulus*). Hier wird das Blut filtriert. Das Filtrat wird zunächst Primärharn genannt. Er stellt ein Ultrafiltrat des Blutplasmas dar. Dieser Primärharn fließt weiter durch den proximalen Tubulus mit Pars convoluta (*engl. proximal convoluted tubule, PCT*) und Pars recta (*engl. proximal straight tubule, PST*), den dünnen Teil der Henle-Schleife (*engl. thin limb, TL*), den dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (*engl. thick ascending limb, TAL*), den distalen Tubulus (*engl. distal convoluted tubule, DCT*) und schließlich über den Verbindungstubulus (*engl. connecting tubule, CNT*) in das Sammelrohr (*engl. collecting duct, CD*), das den Harn ins Nierenbeckenkelchsystem abführt [41]. Jeden Tag werden ca. 180 Liter Primärharn filtriert. Davon werden allerdings maximal nur etwas mehr als 1 %, also ca. 0,5-2,5 Liter Endharn täglich ausgeschieden. Auf seinem Weg durch das Nephron werden dem Primärharn alle für den Körper essentiellen Stoffe wie Glucose, Aminosäuren und wichtige Ionen wieder entzogen. Auch das Wasser wird zu fast 99 % rückresorbiert. Umgekehrt können mit dem Harn auch Ionen und für den Körper giftige Stoffe ausgeschieden werden [32].

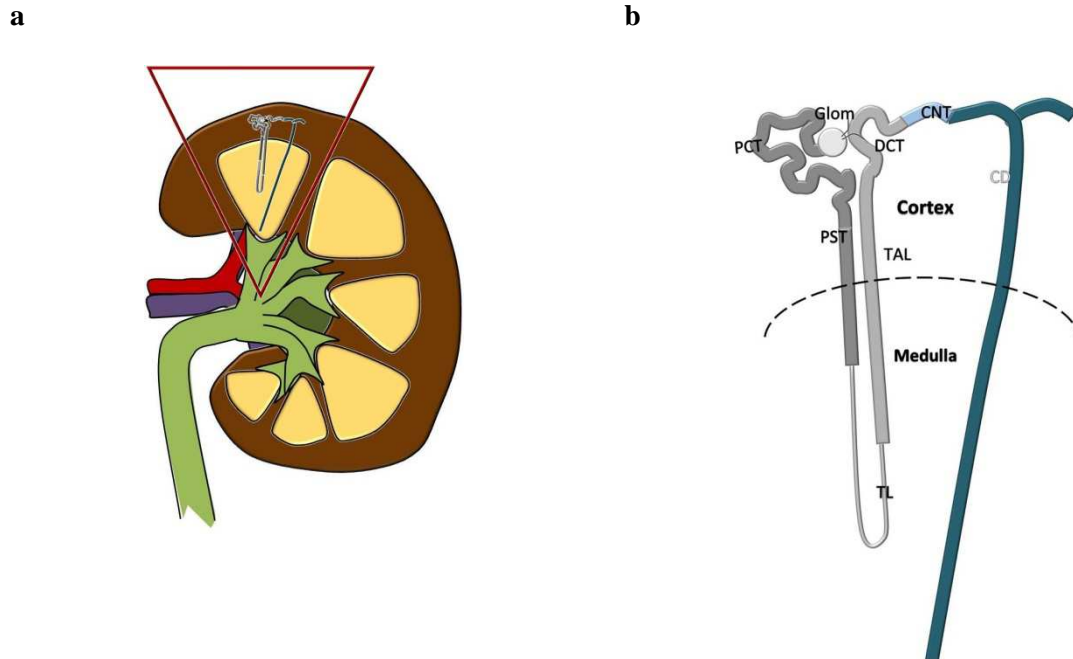


Abbildung 1: Aufbau der Niere. **a** Makroskopisches Modell der Schnittfläche der menschlichen Niere mit sichtbarer Abgrenzung von Rinde (braun) und Mark (gelb) bzw. der Markpyramiden; in grün das Nierenbeckenkelchsystem mit Harnleiter, rot die zuführende A. renalis, in violett die V. renalis dargestellt; im dreieckig gekennzeichneten Bildausschnitt das Nephron in situ. **b** Ausschnitt aus a wie dargestellt: Nephron mit charakteristischem Verlauf der Tubuli; Beschriftung der Nephronabschnitte mit englischen Abkürzungen: GLOM = glomerulus, PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, TL = thin limb, TAL = thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule, CNT = connecting tubule, CD = collecting duct

Bezogen auf den Feinbau der Nierenkanälchen unterscheidet man ein zum Harn gerichtetes lumenales Kompartiment von einem zur Blutseite gerichteten basolateralen Kompartiment. Die Anordnung der Zellen in dieser polaren Ausrichtung (siehe hierzu auch Abbildung 2) ermöglicht einen gerichteten Stofftransport.

Prinzipiell können 2 Teilkräfte für den Transport genutzt werden: (1) Chemische Konzentrationsgradienten, z.B. für Natrium, für das der Gradient nach intrazellulär gerichtet ist und Natrium von der luminalen Seite in die Zelle treibt, oder z.B. für Diffusionsprozesse durch direkte transepitheliale Konzentrationsunterschiede bestimmter Stoffe und Ionen. (2) Elektrische Triebkräfte zum Transport geladener Teilchen entweder über die beiden Zellmembranen, also transzellulär, oder parazellulär über die Tight Junctions (TJs) (s.u.).

Die luminalen Ausstattung der Zellen mit Kanälen und Transportern unterscheidet sich von der basolateralen Seite. Die Na^+/K^+ -ATPase ist stets basolateral lokalisiert. Apikal bzw. luminal befinden sich z.B. Symporter, die die elektrochemische Triebkraft des Natriums nutzen, um gemeinsam mit Natrium z.B. Glucose zu resorbieren und durch die Zelle zu schleusen. Durch diesen

energieaufwendigen und sekundär aktiven transzellulären Stofftransport sammeln sich auf der basolateralen Seite resorbierte Ionen und Stoffe an, die dadurch osmotisch wirksam werden und eine konsekutive Wasserdiffusion nach sich ziehen. Wasser kann sowohl durch die Zellen via Wasserkanäle, die Aquaporine (AQP) heißen, als auch parazellulär durch die TJ vom luminalen in das basolaterale Kompartiment gelangen. [41]. Auf dem parazellulären Weg reißt das Wasser hierbei einen weiteren Anteil gelöster Teilchen mit. Diese Art des Transports, typisch für den proximalen Tubulus, nennt man auch *solvent drag* [32].

Die Mechanismen der transzellulären Resorption von Ionen sind teilweise elektrogen. Dadurch kann zwischen luminalem und basolateralem Kompartiment eine Spannung abgegriffen werden, die man transepitheliales Potential (V_{te}) nennt. Eine Spannung also, die über das gesamte Epithel gemessen werden kann und durch die Tatsache entsteht, dass aktiver und selektiver Transport geladener Teilchen durch die Zelle im Einzelnen erfolgt. Das transepitheliale Potential seinerseits treibt je nach Polung weitere Ionen zur parazellulären Diffusion vom einen in das andere Kompartiment. [32].

Zusammenfassend kann man feststellen, dass das transportierende Epithel der Nierentubuli also über 2 verschiedene Wege verfügt, Stoffe und Wasser zu resorbieren: 1. Der transzelluläre Weg. 2. Der parazelluläre Weg. Dabei werden Konzentrationsunterschiede und elektrische Potentiale als Triebkräfte genutzt. Jeder einzelne Tubulusabschnitt, wie er in Abbildung 1 benannt und dargestellt ist, hat dabei ihm eigene, charakteristische Funktions- und Resorptionseigenschaften.

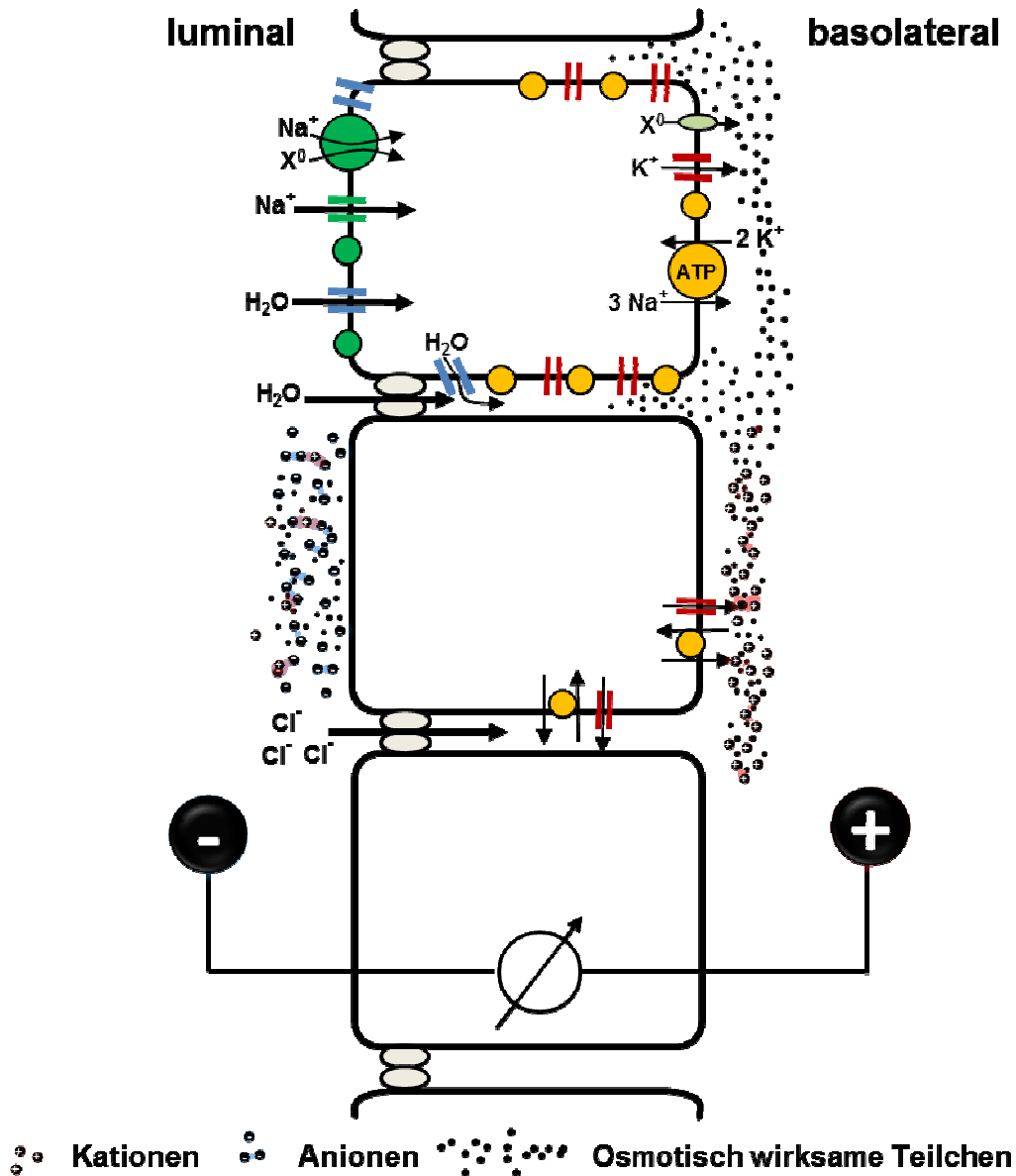


Abbildung 2: Vereinfachtes Modell des epithelialen Transports von NaCl- und H₂O-Transport. In orangegelb ist die Na⁺/K⁺-ATPase dargestellt, in rot der Kaliumkanal, in grün Natriumkanäle und Natriumsymporter, in blau Aquaporine (AQP). Pfeile symbolisieren stets die Richtung des Transports bzw. der Diffusion. X⁰ bezeichnet einen elektroneutralen Stoff X, der die elektrochemische Triebkraft des Natriums zum transzellulären Transport nutzt. Zwischen den Zellen sind die TJs dargestellt. Die Reihenfolge der im Text nacheinander erklärten Prinzipien epithelialen Transports ist in dieser Abbildung von oben nach unten eingehalten. In der ersten Zelle ganz oben der elektrogene transzelluläre Natrium- und Stofftransport und durch basolaterale Anhäufung die osmotische Resorption von Wasser, trans- und parazellulär. In der zweiten Zelle ist das Prinzip des elektrischen Gradienten über das Epithel veranschaulicht. Durch elektrogene Natriumresorption entsteht sowohl ein elektrischer Gradient für negativ geladene Teilchen wie Chlorid, die aus dem Lumen den parazellulären Weg auf die basolaterale Seite suchen, als auch ein chemischer Konzentrationsgradient, der die parazelluläre Diffusion unterstützt. In der dritten ein Spannungsmesser abgebildet, der das in diesem Fall lumenegative transepitheliale Potential V_{te} anzeigt.

1.1.2 Tight Junctions

Tight Junctions (TJs) sind essentielle Zell-Zell-Kontakte, die die Integrität und Polarität eines jeden Zellverbandes vermitteln und garantieren können. Sie imponieren mikroskopisch als dicht an dicht gürtelförmig um die Zelle herumlaufende *Zonula occludens* (lat. Verschließender Gürtel, Abbildung 3) und sind die am weitesten apikal gelegene Komponente des sogenannten Haftkomplexes (auch Schlussleistenkomplex oder junctionaler Komplex). Dieser versiegelt die Interzellulärspalten in ein- und mehrschichtigen Epithelien sowie Endothelien.

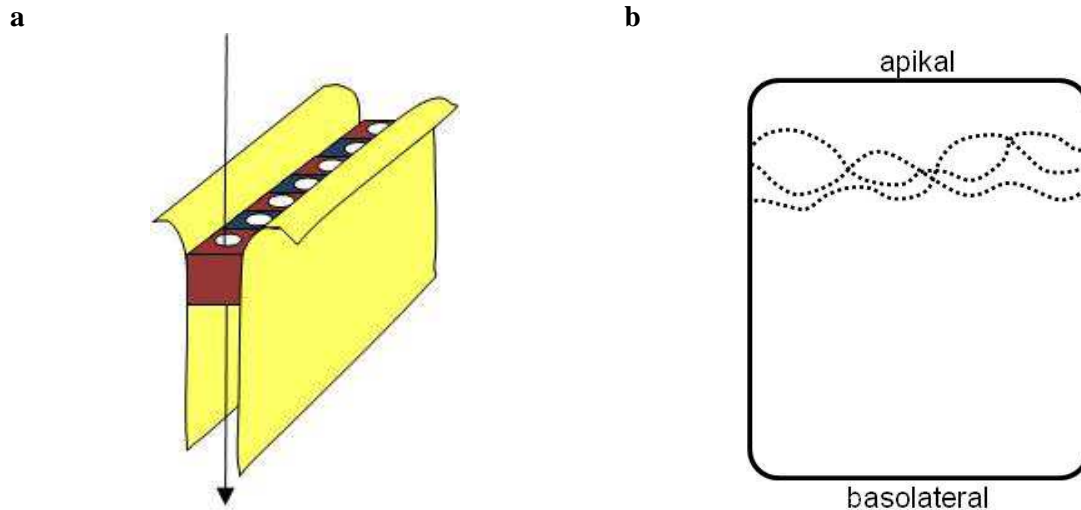


Abbildung 3: Morphologie der Tight Junctions. **a:** Veranschaulichung des Porencharakters der TJ: Transmembranproteine von beiden Zellen formen porenförmige Strukturen und überbrücken den Interzellulärspalt [41]. **b:** Schematische Darstellung der Anordnung der TJ-Proteine in verzweigten Strängen; Aufsicht auf die äußere Zellmembran einer von einer anderen Zelle gelösten Zelle

Das Epithel kann dann zwischen lumenalem und basolateralem Kompartiment eine Diffusionsbarriere bilden. Beide Kompartimente können dabei eine jeweils völlig unterschiedliche chemische Zusammensetzung aufweisen. TJs erlauben Dichtigkeit ebenso wie selektive Durchlässigkeit und in der Niere kommt ihnen diesbezüglich eine ganz besondere Bedeutung zu. Wie schon zuvor ausgeführt ist die Voraussetzung für den parazellulären Transport die Passage der TJs, die hier je nach Tubulussegment sowohl versiegelnden als auch leitenden Charakter haben können. Dabei können sie selektiv für bestimmte Ionen und Wasser durchlässig oder undurchlässig sein [41, 53]. Die Proteine Claudin und Occludin sind die entscheidenden Transmembranproteine, die die Zellen im Bereich der TJ untereinander verbinden. Abbildung 4 zeigt schematisch morphologische Grundlagen dieser Verbindung. Zwischen den Zellen bilden sich durch Proteininteraktion Ketten und Stränge von Claudinen und weiterer assoziierter Proteine [16, 41]. Es konnte gezeigt werden, dass also zwischen zwei Zellen nicht nur ein Gürtel von TJs besteht sondern ein regelrechtes Netzwerk [7, 31, 53]. Zudem

besteht zwischen der Anzahl der vorhandenen TJ-Stränge und dem elektrischen transepithelialen Widerstand (R_{te}) als Maß für die Dichtigkeit eines Epithels ein enger Zusammenhang [9].

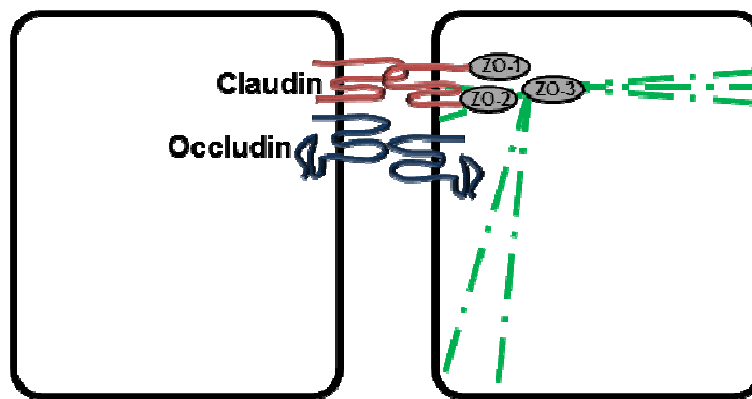


Abbildung 4: Molekularer Feinbau der Tight Junction. Der eigentlich im Verhältnis zur Zelle schmale Saum der TJs ist hier der Detailgenauigkeit geschuldet vergrößert dargestellt. Man erkennt transmembranäre Proteine, die Claudine und Occludine, die je zwei extrazelluläre Schleifen bilden und miteinander interagieren. Die Matrixproteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 vermitteln die Verankerung mit den in grün dargestellten Aktinfilamenten des Zytoskeletts. Weitere Adhäsionsproteine sind der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

1.1.3 Claudine

Claudine sind derzeit in 27 Isoformen bekannt und kommen ubiquitär in TJs von Epithelien und Endothelien vor, [15]. Sie sind entscheidend für die spezifische Funktion der TJ [16, 41, 53]. Die Claudin-Ausstattung eines Zellverbandes bestimmt die parazelluläre Durchlässigkeit und die Größen- und Ladungselektivität [54]. Der molekulare Aufbau ist in Abbildung 4 in der Übersicht bereits gezeigt. Claudine sind Transmembranproteine, die aus zwei extrazellulären Schleifen, einer intrazellulären Schleife sowie zytosolischen N- und C-Termini bestehen. Untereinander interagieren die Claudine über ihre extrazellulären Schleifen. Die Größen- und Ladungselektivität beruht vor allem auf der hier lokalisierten Aminosäuresequenz und ihrer 3-dimensionalen Anordnung [49, 54]. Die C-terminale PDZ-Domäne ermöglicht zusätzlich die Interaktion mit dem Zytoskelett via Adapterproteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3, wie sie ebenfalls in Abbildung 4 dargestellt sind.

Die Bildung von Strängen erfolgt durch Proteininteraktion der Claudine untereinander [53]. Dabei können in einem TJ-Strang mehrere Subtypen von Claudinen vorkommen. Auch der interzelluläre Kontakt zwischen Claudinen kann homomer oder auch heteromer erfolgen [31, 53]. Die Claudinexpression kann ergänzend auf Protein-Ebene vielfältig reguliert werden. In erster Linie geschieht dies durch Phosphorylierungsvorgänge. Diese wiederum können durch zahlreiche physiologische und pathologische Stimuli ausgelöst werden [53].




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 ^{1(IF)}	Claudin 2 ^{1(IF)} Claudin 2 ^{2(IF, isH)}				Claudin 3 ^{1(IF)}		
				Claudin 4 ^{1(IF)}			Claudin 4 ^{1(IF), 3(IF)}
			Claudin 7 ^{4(IF)}				Claudin 7 ^{4(IF)}
			Claudin 8 ^{4(IF)}	Claudin 8 ^{1(IF)}			Claudin 8 ^{4(IF), 1(IF)}
	Claudin 10 ^{1(IF)}			Claudin 10 ^{5(IF)}		Claudin 10 ^{1(IF)}	
	Claudin 12 ^{6(NB, PCR)}					Claudin 14 ^{7(PCR)}	Claudin 14 ^{8(X)}
						Claudin 16 ^{1(IF)}	
					Claudin 16 ^{10(IF)}	Claudin 16 ^{9(PCR)}	
			Claudin 17 ^{11(IF)}				
						Claudin 18 ^{12(IF)}	Claudin 18 ^{12(IF)}
						Claudin 19 ^{9(PCR)}	
					Claudin 19 ^{10(IF)}		

Abbildung 5: Claudinprofil des murinen Nephrons.

Übersicht der Nachweise verschiedener Claudine in den einzelnen Nephronabschnitten von Mäusenieren mit Angabe des jeweils verwendeten Nachweisverfahrens; IF = Immunfluoreszenz, isH = in situ Hybridisierung, PCR = Polymerase Kettenreaktion, NB=Northern Blotting, X=X-Gal Färbung; ¹[31], ²[12], ³[25], ⁴[40], ⁵[6, 52], ⁶[1], ⁷[13], ⁸[4], ⁹[34], ¹⁰[2], ¹¹[35], ¹²[23], ¹³[38]. (Abbildung erarbeitet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Vera Wulfmeyer, Physiologisches Institut der CAU Kiel)

Bezogen auf die Niere variiert die Claudinausstattung der TJs entlang des Nephrons, sodass jedem Nephronabschnitt ein bestimmtes Claudinprofil zugeordnet werden kann (Abbildung 5). Das Claudinprofil ist nicht gleichzusetzen mit dem Funktionsprofil des jeweiligen Abschnittes, jedoch ist es entscheidend damit verknüpft [31].

Einige im Weiteren wichtige Claudine seien im Folgenden mit ihren bisher beschriebenen Eigenschaften vorgestellt.

1.1.3.1 Claudin 8

Es wird angenommen, dass Claudin 8 ein Anionen-selektives Claudin ist, das abhängig vom Zelltyp entweder als Natriumbarriere [51, 55] oder Chloridpore [44, 54] beschrieben wurde. In der Niere kommt es vor allem in den distalen Nephronabschnitten vor. In Sammelrohrzellen bildet Claudin 8 gemeinsam mit Claudin 4 einen Komplex in der TJ, der den Chloridtransport regelt [17, 54]. Die Anionen-Selektivität verhindert *in vivo* den Rückstrom von Kationen, insbesondere von Natrium,

zurück in das Lumen. Claudin 8 konnte im gesamten Aldosteron-sensitiven distalen Nephron und in der dünnen absteigenden Henle-Schleife nachgewiesen werden [40, 54].

1.1.3.2 Claudin 19

Das Vorkommen von Claudin 19 konzentriert sich in der Niere hauptsächlich auf die dicke aufsteigende Henle-Schleife (TAL). Zu einem geringeren Anteil wurde es bisher auch im distalen Tubulus (DCT) beschrieben [17]. Auch im innermedullären Sammelrohr von Menschen-, Ratten- und Mäusenieren konnte es immunfluoreszenzmikroskopisch schon nachgewiesen werden [38]. Die Anwesenheit von Claudin 19 korreliert mit der epithelialen Barrierefunktion und erhöht die Dichtigkeit und Festigkeit eines Epithels. Dieser Effekt kann sowohl auf einer Kationen- als auch auf einer Anionenbarrierefunktion beruhen [17]. Es konnte außerdem in einem *in vitro* Modell gezeigt werden, dass Claudin 19 in der TAL mit Claudin 16 interagieren muss, um dort korrekt in die TJ eingefügt zu werden und volle Funktionsfähigkeit erreichen zu können. Beide Claudine haben dann additive Effekte um die parazelluläre Permeabilität für Natrium gegenüber der von Chlorid zu steigern [23].

1.1.3.3 Claudin 10

Claudin 10 existiert in 2 Isoformen, dem Claudin 10a und dem Claudin 10b. In der Niere kommt Claudin 10a im PT vor und Claudin 10b in der TAL [6]. Claudin 10a wird dabei als Anionen- und Claudin 10b als Kationepore diskutiert. Claudin 10 unterscheidet sich von anderen Poren-bildenden Claudinen dahingehend, dass neben der Ladungs- eine ausgesprochene Größenselektivität besteht [17]. Zusätzlich wird Claudin 10 auch in dünnen Schleifen gefunden, wobei noch nicht vollständig geklärt ist, um welche Isoform es sich handelt [43].

1.1.4 Das Sammelrohr

Der für diese Arbeit hinsichtlich seiner trans- und parazellulären Transportvorgänge sowie seiner Claudinexpression im Interesse stehende Nephronabschnitt ist das Sammelrohr. Das Sammelrohr ist der letzte Nephronabschnitt, bevor der Endharn in das Nierenbecken gelangt. Die Rückresorption essentieller Stoffe ist in diesem Abschnitt weitestgehend abgeschlossen. Transzelluläre Transportvorgänge überwiegen hier die parazellulären und sind hormonell strikt reguliert [53]. Das distale Nephron gilt als am stärksten abgedichteter Abschnitt des Nephrons, was im Einklang mit der bisher postulierten parazellulären Barrierefunktion insbesondere gegenüber Kationen und Wasser steht [40].

In Abbildung 6 ist ein Zellmodell des Sammelrohrs dargestellt. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf der Sammelrohrhauptzelle. Die hier mit dargestellten Nebenzellen sind der Vollständigkeit halber abgebildet.

Die Hauptzelle resorbiert luminal Natrium durch epitheliale Natriumkanäle (ENaC). Dabei folgt das

Natrium dem durch die Na^+/K^+ -ATPase und Kaliumkanäle aufrechterhaltenen elektrischen Gradienten in die Zelle. Basolateral wird das Natrium wieder ATP-abhängig in den Extrazellulärraum gepumpt. Für die im Lumen verbleibenden Chloridionen ergibt sich ein lumen negatives transepitheliales Potential, welches selbige wiederum parazellulär zur basolateralen Seite treibt. Es besteht also eine gewisse parazelluläre Permeabilität für Chlorid [32].

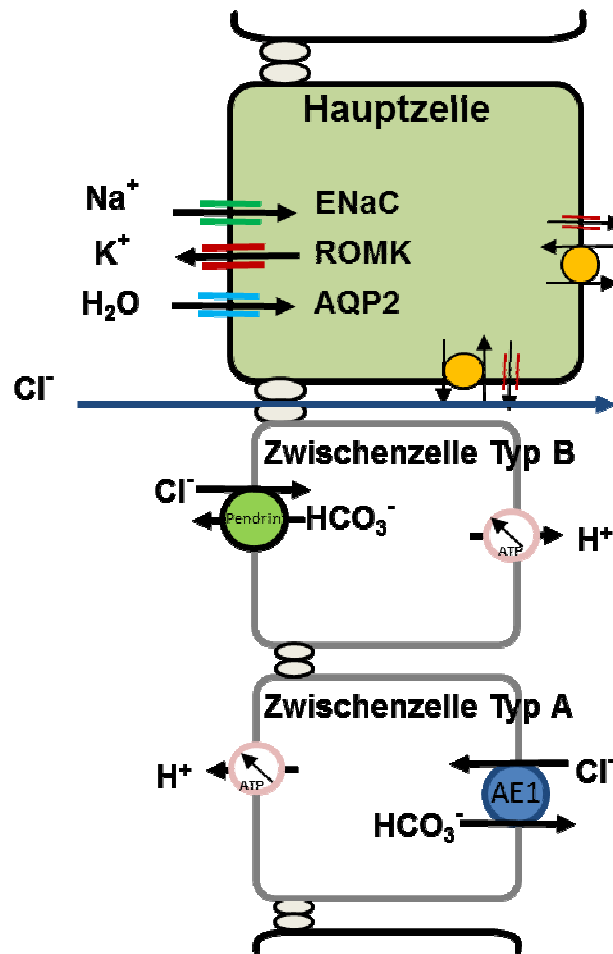


Abbildung 6: Zellmodell Sammelrohr. Oben die Hauptzelle dargestellt, darunter die Zwischenzellen vom Typ B und A. In gelb ist die Na^+/K^+ -ATPase dargestellt, zusammen mit einem Kaliumkanal in rotbraun. In der Hauptzelle sind die drei wichtigen luminalen Kanäle mit dem entsprechenden Namen eingezeichnet. Die Protonenpumpe $v\text{-H}^+$ -ATPase befindet sich in der luminalen Membran der Typ A- und in der basolateralen Membran der Typ B- Zellen. Zusätzlich kommt jeweils ein spezifischer Anionenaustauscher vor, Pendrin in Typ B-Zellen und AE1 in Typ A-Zellen.

Wasser wird transzellulär über Aquaporine (AQP) reabsorbiert. Die Sammelrohrhauptzelle ist nur wasserdurchlässig, wenn sie durch das Antidiuretische Hormon (ADH) stimuliert wird. Bei Wassermangel oder Hypotonie führt das ADH zum membranären Einbau luminaler AQP2 sowie zu erhöhter Offenwahrscheinlichkeit epithelialer Natrium Kanäle (ENaC). Die konsekutive Expansion

des extrazellulären und somit auch des intravasalen Volumens kann und soll zum Blutdruckanstieg führen. In Abwesenheit von ADH erfolgt keine weitere Wasserrückresorption im Sammelrohr [32]. Die Zwischenzellen stehen, stark vereinfacht gesagt, im Dienst der Säure-Basen-Regulation. Es kann sowohl eine protonengestützte Harnansäuerung wie auch eine Harnalkalisierung durch Bikarbonat erfolgen [32].

1.1.5 Mechanismen der Harnkonzentrierung

Die Niere verfügt über einzigartige Mechanismen zur Konzentrierung des Harns und hat damit entscheidenden Einfluss auf die Wasserhomöostase. Ort der Harnkonzentrierung ist die Medulla des Nierenmarks. Entscheidende Voraussetzungen für die dortige Harnkonzentrierung sind ein kortikomedullärer osmotischer Konzentrationsgradient, eine Blutversorgung im Gegenstromprinzip, eine Rezirkulation von Harnstoff sowie eine geregelte Wasserdurchlässigkeit des Sammelrohrs. So kann die Urinosmolalität beim Menschen zwischen 1200 mosm/kg H₂O bei Antidiurese und 50 mosm/kg H₂O bei Wasserdiurese variieren [32]. Abbildung 7 zeigt ein Modell des Nephrons mit Darstellung des kortikomedullären osmotischen Gradienten.

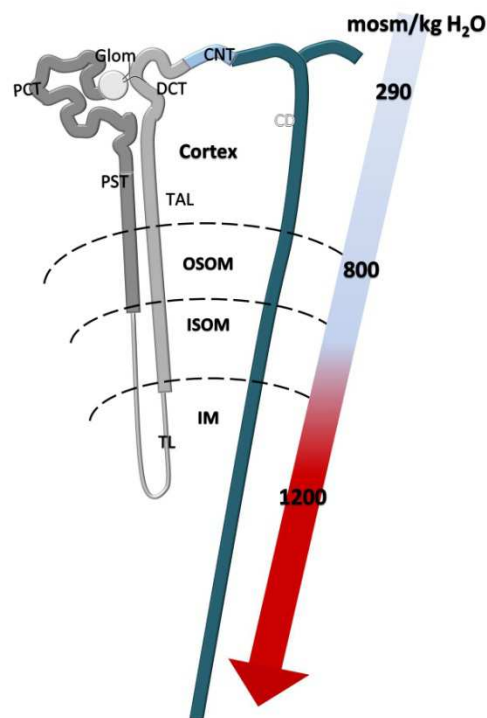


Abbildung 7: Nephronmodell mit Darstellung des kortikomedullären osmotischen Gradienten.

Beschriftung der Nephronabschnitte mit englischen Abkürzungen: GLOM = glomerulus, PCT = proximal convoluted tubule, PST = proximal straight tubule, TL = thin limb, TAL = thick ascending limb, DCT = distal convoluted tubule, CNT = connecting tubule, CD = collecting duct; OSOM = outer stripe of outer medulla, ISOM = inner stripe of outer medulla, IM = inner medulla

Die hohe Osmolalität im Nierenmark wird insbesondere bedingt durch Harnstoff und NaCl Rückresorption, in Kombination mit der regulierten Wasserdurchlässigkeit der einzelnen Nephronabschnitte. Der PT und der dünne absteigende Ast der Henle-Schleife sind sehr wasserdurchlässig und Wasser kann ungehindert osmotischen Gradienten folgen. Im Mark sind die dünne aufsteigende Henle-Schleife und der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife wasserdicht, trotzdem findet hier ein massiver Stofftransport ins Interstitium bzw. ins Blut statt, so dass die osmotischen Gradienten aktiv (TAL) aufgebaut bzw. weiter multipliziert werden können (dünner Abschnitt der Henle-Schleife). Die Anordnung der Blutgefäße, der sogenannten Vasa recta nach dem Gegenstromprinzip verhindert ein Auswaschen des Gradienten. Das Sammelrohr ist reguliert wasserdurchlässig und nutzt unter der Kontrolle von ADH den von der Henle-Schleife aufgebauten osmotischen Gradienten zur Wasserrückresorption.

Je nach Urin-Konzentration besteht in der inneren Medulla ein sehr großer chemischer und osmotischer Gradient von basolateral nach luminal und es wird deutlich, wie wichtig die gerichtete parazelluläre Barriere gegenüber Ionen oder Wassern in diesem Nephronabschnitt ist.

1.2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Claudinexpression und der Einbau der Claudine in die TJ werden fein reguliert und abgestimmt. Im Rahmen meiner Arbeit habe ich überprüft, ob auch die Osmolalität im Extrazellulärmilieu der Zellen einen regulierenden Effekt auf die Claudine des Sammelrohres haben kann, da Microarray-Expressionsstudien der „Arbeitsgruppe Nierenphysiologie“ um Prof. Dr. med Schlatter und Dr. rer. nat. Bayram Edemir der Uniklinik Münster gezeigt haben, dass Osmolalität und ihre Änderung in primär kultivierten innermedullären Sammelrohrzellen (IMCD-Zellen) der Ratte einen Einfluss auf die Expression multipler Gene hat, darunter auch auf die zahlreicher Claudingene. Da eine Änderung in der mRNA Expression von Claudinen, vorausgesetzt sie mündet in einer tatsächlich veränderten Proteinexpression, eng verknüpft sein kann mit einer Änderung der parazellulären Transportcharakteristika eines Epithels, war das Augenmerk meiner Arbeit insbesondere auf den parazellulären Transport gerichtet. Ergänzt wurden die funktionellen Messungen durch Immunfluoreszenzmikroskopie, um eine grobe Mengenabschätzung der relevanten Claudine und deren zelluläre Lokalisation in Bezug auf die TJ zu erhalten. Grundlage für alle Versuche ist die Primärkultur von o.g. IMCD-Zellen, ihre Kultivierung auf durchlässigen Filtermembranen, um ein luminales und basolaterales Kompartiment zu imitieren, sowie die Anpassung der Osmolalität der Kulturmedien auf 300, 600 und 900 mosm/kg H₂O, sodass 3 Gruppen verglichen werden konnten (300-IMCD-Zellen, 600-IMCD-Zellen, 900-IMCD-Zellen). Es ergaben sich folgende konkrete Fragestellungen:

- Wie verändern sich der transepitheliale Widerstand, das durch die Zellen generierte transepitheliale Potential sowie die Fähigkeit zum Stofftransport?
- Werden die Proteinexpression von Claudinen und ihre Beziehung zur TJ durch Variation in der Osmolalität moduliert?

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle benutzten Chemikalien waren von hoher Qualität und Reinheit und wurden bei den Firmen SIGMA, Merck und Carl Roth bestellt.

2.2 Experimentallösungen

Tabelle 1: Experimentallösungen

	Kontrolllösung	Niedrig-Natrium-Lösung
300 mosm/kg	mM	mM
NaCl	145,0	30,0
KH ₂ PO ₄	0,4	0,4
K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	1,6	1,6
Glucose	5,0	5,0
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1,0	1,0
Ca-Gluconat * 1H ₂ O	1,3	1,3
Mannitol		230,0
600 mosm/kg	mM	mM
NaCl	245,0	50,0
KH ₂ PO ₄	0,4	0,4
K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	1,6	1,6
Glucose	5,0	5,0
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1,0	1,0
Ca-Gluconat * 1H ₂ O	1,3	1,3
Harnstoff	100,0	100,0
Mannitol		390,0
900 mosm/kg	mM	mM
NaCl	345,0	70,0
KH ₂ PO ₄	0,4	0,4
K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	1,6	1,6
Glucose	5,0	5,0
MgCl ₂ * 6H ₂ O	1,0	1,0
Ca-Gluconat * 1H ₂ O	1,3	1,3
Harnstoff	200,0	200,0
Mannitol		550,0

Der pH der jeweiligen Lösung wurde mittels Zugabe von NaOH oder HCl auf 7,4 eingestellt. Die Osmolalität aller Lösungen wurde kontrolliert (OSMOMAT©030, Gonotec) und gegebenenfalls mit Mannitol angepasst, entsprechend dem korrespondierenden Zellkulturmedium in dem die Zellen kultiviert wurden.

Stoff	Lösungsmittel	Stammkonzentration mM
Amilorid	DMSO	50

Die Stammkonzentration der Amilorid-Stammlösung wurde 1:1000 mit der jeweiligen Kontroll- oder Niedrig-Natriumlösung verdünnt. Die DMSO-Konzentration betrug nicht mehr als 0,1 %.

2.3 Präparation der IMCD-Zellen

Die Präparation der Nierenmedulla aus Rattennieren sowie die Aufbereitung des Gewebes zur Gewinnung von IMCD Primärzellen folgte im Wesentlichen einem schon zuvor beschriebenen Protokoll [42]. Abbildung 8 zeigt den schematischen Ablauf von der Präparation bis zum Kulturansatz der IMCD Primärzellen.

2.3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Wistar- oder Sprague-Dawley-(=SD-) Ratten beiderlei Geschlechts. Auswahlkriterium war ein Gewicht von 200 bis 300 g. Die Tiere hatten vor der Präparation freien Zugang zu Wasser.

2.3.2 Präparation Nierenmedulla

Die Ratten wurden mittels Isofluran-Narkose anästhesiert. Über eine Längslaparotomie erfolgte die stumpfe Präparation des Retroperitoneums zur Freilegung der großen Bauchgefäße. Mittels Kanülierung der Bauchaorta mit einer 10 ml Spritze (21 G Kanüle) wurden die Tiere exsanguiniert. Beide Nieren wurden anschließend sofort in steriler Technik entnommen und in eiskaltes steriles PBS (engl.: *phosphate buffered saline*, PAA Laboratories GmbH) verbracht. Die weitere Präparation erfolgte in einer Sterilbank (Sterilbank HERASAFE, Heraeus). Die Nieren wurden hier dekapsuliert und längs der Mitte aufgeschnitten, sodass die Papille auf einer der Hälften verblieb. Mit einer gebogenen Schere wurden die weiß schimmernden Anteile der inneren Medulla herausgeschnitten und in einigen Tropfen sterilem PBS gesammelt. Die Gewebestücke wurden anschließend mit einer sterilen Rasiermesser Klinge fein zerkleinert und die entstehende Gewebesuspension konnte mit einer steril gekürzten 1 ml Pipette in ein Eppendorf-Gefäß mit vorbereiteter Enzymlösung überführt werden.

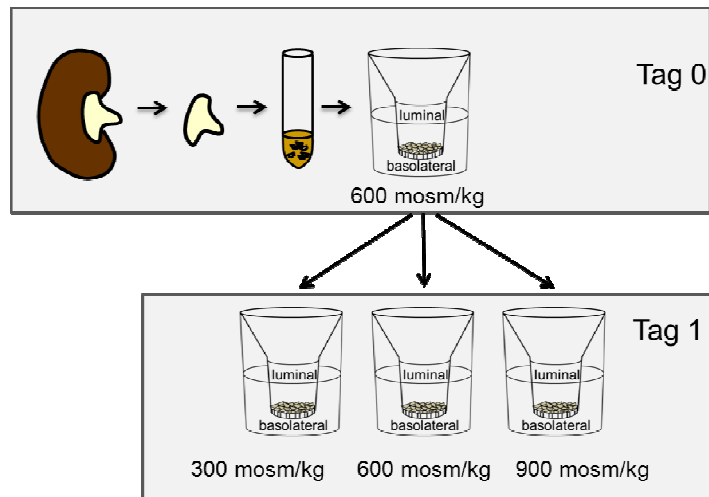


Abbildung 8: Schema Präparation und Aufbereitung der IMCD Primärzellen. An Tag 0 wurden die Nieren steril entnommen, die innere Medulla zerkleinert und auf permeablen Filtereinsätzen kultiviert. Ab Tag 1 erfolgte die Kultivierung unter drei verschiedenen Osmolalitäten.

2.3.3 Enzymlösung

Die Enzymlösung wurde unmittelbar vor der Präparation der IMCD-Zellen angesetzt. Dabei wurde ein Volumen von 1 ml Enzymlösung für ein Paar Rattennieren verwendet. Für 1 ml Enzymlösung wurden 2 mg Hyaluronidase Typ I (SIGMA) sowie 2,2 mg Collagenase Typ II (Biochrom AG) eingewogen, in 1 ml PBS gelöst und im Anschluss mit einem 0,2 µm Spritzenfilter steril filtriert.

2.3.4 Gewebeverdau

Die Gewebesuspension in Enzymlösung wurde bei 850 rpm und 37 °C für 90 Minuten im Thermomixer (Eppendorf) belassen. Nach der Hälfte der Zeit, also nach 45 Minuten, wurde das Gewebe unter der Sterilbank mit einer 1 ml Pipettenspitze durch Auf- und Abpipettieren weiter homogenisiert und danach für die restlichen 45 Minuten unter oben genannten Bedingungen weiter verdaut.

Zur Beendigung der Verdauungsphase wurde die Enzymlösung bei 2500 U/min für 5 Minuten abzentrifugiert und als Überstand verworfen. Die Resuspension des Zellpellets erfolgte zunächst 2 Mal in sterilem PBS. Nach diesen Waschschritten wurde das Zellpellet in angewärmtem Medium resuspendiert. Mit einer Zählkammer (Neubauer Improved) wurde die Gesamtzellzahl der Suspension ermittelt. Daran orientiert wurden die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät, (Abbildung 8).

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kulturfläche

Zellen wurden auf Filtern (Costar Transwell Permeable Supports, Corning Life Sciences, SIGMA) mit einer Fläche von 0,33 cm² in unterschiedlichen Zelldichten von ungefähr 100.000/cm² [42],

350.000/cm² [26] oder 600.000/cm² [26] ausgesät. Die unterschiedlich gewählten Zelldichten hingen maßgeblich von der unterschiedlichen Zellausbeute pro Präparation ab. Einige Zellen wurden parallel in einer 24-well-Platte auf runden Deckgläsern kultiviert. Alle Kulturflächen waren mit Kollagen beschichtet. Die Kollagenbeschichtung erfolgte in einer Dichte von 2 µg/cm² mit Maus Kollagen IV (mouse Collagen IV, BD Biosciences). Für die Beschichtung der Filter wurde eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von 13,2 µg/ml hergestellt, sodass 50 µl Volumen die entsprechend gewünschte Dichte von 2 µg/cm² Kollagen auf der 0,33 cm² großen Filterfläche garantierten. Die Verdünnung erfolgte mit 0,1% Essigsäure. Die Arbeitslösung wurde vor Verwendung über einen 0,2 µm Spritzenfilter steril filtriert. Die Kollagenlösung wurde entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf der zu beschichtenden Fläche belassen und danach verworfen. Die Kulturfläche wurde anschließend einmalig mit PBS gewaschen. Für andere Flächen wurde unter Anpassung der Beschichtungsvolumina die gleiche Arbeitslösung verwendet.

2.4.2 Zellkulturmedium

Als Zellkulturmedium wurde DMEM (engl.: *Dulbecco's modified Eagles medium*, PAA Laboratories GmbH) mit hohem Glucoseanteil (4g/L) verwendet. Mediumzusätze waren das definierte Serum Ultrosor G (CytoGen GmbH) in einer Konzentration von 1 %, NEA (nicht essentielle Aminosäuren, PAA Laboratories GmbH) 1%, L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH) 1 %, Penicillin/ Streptomycin (100 µg/ml, PAA Laboratories GmbH) 1%, sowie je nach gewünschter Osmolalität NaCl und Harnstoff (Zellkultur geeignet, SIGMA). Für normales DMEM wurde eine Osmolalität von 300 mosm/kg H₂O angenommen. Die Osmolalität wurde mit je 100 mM Harnstoff und NaCl auf 600 mosm/kg H₂O sowie mit je 200 mM Harnstoff und NaCl auf 900 mosm/kg H₂O angehoben und mit einem Osmometer (OSMOMAT©030, Gonotec) kontrolliert.

2.4.3 Kultivierung

Zellen wurden im Inkubator (CO₂-Inkubator HERAcell, Thermo Scientific) bei 37 °C und 8% CO₂ 6-7 Tage lang kultiviert. Täglich wurde das Medium erneuert sowie gegebenenfalls der transepitheliale Widerstand mit einem dafür vorgesehenen Messsystem („EVOM²“, World Precision Instruments) gemessen. Als *iso*-osmolare Bedingungen für primäre Kulturen von IMCD-Zellen wurden 600 mosm/kg H₂O vorausgesetzt [42]. Am Tag der Präparation (Tag 0, Abb. 8) wurden deshalb alle Kulturen mit 600 mosm/kg DMEM kultiviert, ab dem ersten Tag erfolgte die Aufteilung in Gruppen mit 300, 600 und 900 mosm/kg DMEM (300-IMCD-Zellen, 600-IMCD-Zellen, 900-IMCD-Zellen). Zur ersten Beurteilung der Zellmorphologie und der Integrität des Zellverbandes wurden die auf Deckgläsern ausgesäten Zellen an Tag 6 oder 7 mit einem Kamera gekoppelten Mikroskop (Leica M165C, Zeiss Axio Observer D.1) betrachtet und Bilder zur Dokumentation festgehalten.

2.5 Ussing Kammer Versuche

Die Ussing Kammer bietet die Möglichkeit, transepitheliale Widerstände, Ströme und Potentiale zu messen [39]. Die durchgeführten Versuche dienten so zur funktionellen Charakterisierung der kultivierten IMCD Zellen.

2.5.1 Konstruktion der Kammer

Die verwendete Ussing Kammer (EPDevices, Willy van Driessche) wurde speziell für die verwendeten Costar Filter konstruiert (Abbildung 9). Der eingebaute Filter trennt eine obere von einer unteren Halbkammer, entsprechend einer luminalen und einer basolateralen Seite, die unabhängig voneinander mit Lösungen perfundiert werden konnten. Dichtungsringe garantierten einen festen Sitz des Filters in der Kammer. Das auf dem Filter festgewachsene Epithel fungierte als Trennfläche zwischen luminaler und basolateraler Halbkammer auf Ebene des Filterbodens. Jede Halbkammer verfügte über ein eigenes Zu- und Ablaufsystem. Die Zulaufschläuche wurden durch Heizrohre (SH-27B, Warner Instruments) gekoppelt an eine Temperaturkontrolle (TC344B Dual Automatic Temperature Controller, Warner Instrument Corporation) geleitet, die so eingestellt waren, dass die das Epithel erreichende Lösung 37°C warm war. Zudem ließ sich die Geschwindigkeit, mit der die Lösungen durch das System flossen, über Stellschrauben regulieren.

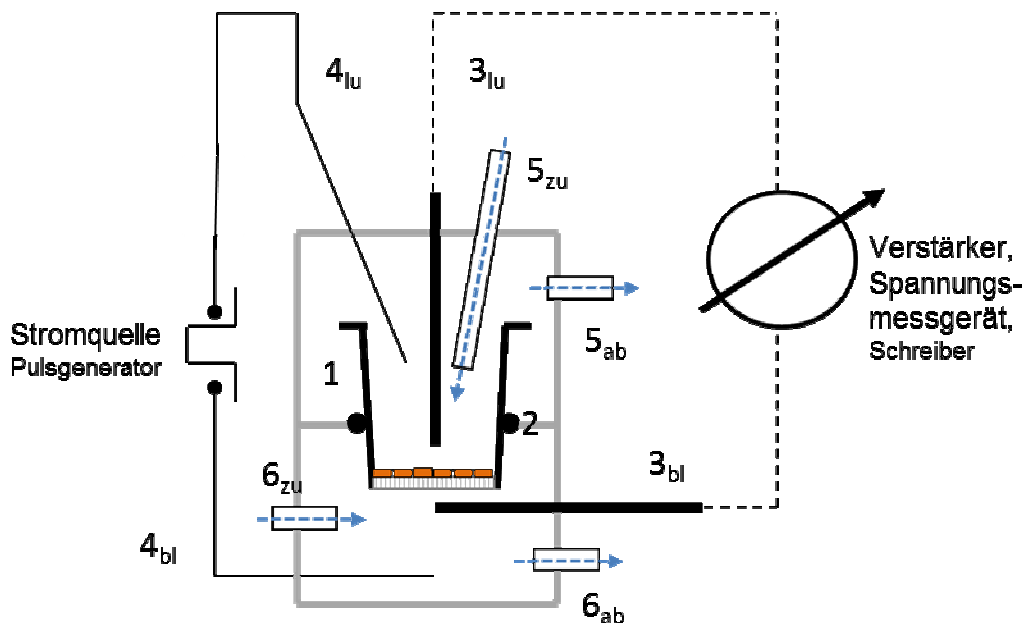


Abbildung 9: Schematischer Aufbau der Ussing Kammer.

1 Filter mit Zellverband, 2 Dichtungsring, der luminalen und basolateralen Seite voneinander abschirmt, 3 Spannungselektroden, die luminal (**lu**) und basolateral (**bl**) die Spannung messen und zum Spannungsmeßgerät leiten, 4 Stromelektroden, die die vom Pulsgenerator kommenden Strompulse luminal (**lu**) und basolateral (**bl**) applizieren, 5 Flüssigkeitsleitungen, die den Zu- und Abfluss (**zu, ab**) auf der luminalen Seite regeln, 6 Flüssigkeitsleitungen, die den Zu- und Abfluss (**zu, ab**) auf der basolateralen Seite regeln.

Jeweils 4 mit Dreiwegehähnen verbundene Spritzen, die ungefähr 30 cm über der Ussing Kammer angebracht waren, ermöglichten schnelle Lösungswechsel und einen kontinuierlich aufrecht gehaltenen Fluss in beiden Halbkammern. Je eine Mess- und Stromelektrode wurden sowohl luminal als auch basolateral in das System integriert. Es wurden chlorierte Silberdrahtelektroden und für die Messelektroden zusätzlich Agarbrücken (2,5% Agaragar in 1 M KCl) verwendet. Ein Pulsgenerator (Ussing Amplifier UPG3, AD Elektronik Buchenbach) injizierte über die Stromelektroden alle 7 s für eine Dauer von 2 s einen Strompuls von 1 μA . Über die Messelektroden wurde die hierdurch generierte und vom Gesamtwiderstand des Systems abhängige Spannungsänderung ΔV_{te} sowie die vom Epithel selbst generierte Spannung V_{te} erfasst. Ein analoger Schreiber (Kipp und Zonen, Schreiber-geschwindigkeit 0,2 mm/s), der über einen Verstärker (100 mV/mV) in das Messsystem eingegliedert war, zeichnete über die gesamte Versuchsdauer V_{te} und ΔV_{te} auf.

2.5.2 Grundlage der Messtechnik

Epithelien mit polarer Ausrichtung der Zellen und dichter Verbindung der Einzelzellen über TJs untereinander, können über elektrogene Ionentransporte ein transepitheliales Potential (V_{te}) generieren [32] (Siehe auch Abbildung 2).

Im klassischen Ussing Kammer Aufbau wird die Spannung V_{te} experimentell auf 0 mV geklemmt, um den Kurzschlussstrom I_{sc} , der den Ionentransport über das Epithel reflektiert, zu messen. Um dem Gewebe aber diese hohe Strominjektion zu ersparen, kann der äquivalente Kurzschlussstrom I'_{sc} auch mit dem Ohm'schen Gesetz berechnet werden [39]. V_{te} wird hierbei direkt gemessen und kontinuierlich aufgezeichnet. Der in der Ussing-Kammer regelmäßig und kurz applizierte Strom von 1 μA (s.o.) führt zu einer Spannungsänderung ΔV_{te} , die proportional zum Gesamtwiderstand R des Systems ist, der wie folgt berechnet wird:

$$R = \frac{\Delta V}{I} \quad \text{Formel 1}$$

$R = \text{Widerstand in } \Omega, \Delta V = \text{Spannungsänderung in V}, I = \text{Strompuls in A}$

Der abgelesene Wert für den Widerstand wurde um den vom beschichteten Leerfilter generierten Widerstand korrigiert und mit der Filterfläche multipliziert um den Flächenwiderstand R_{te} (in Ωcm^2) zu erhalten

Der errechnete Gesamtwiderstand des Epithels R_{te} lässt sich unter Einbeziehung der ebenfalls abzulesenden und vom Epithel selbst generierten Spannung V_{te} zur Berechnung des äquivalenten Kurzschlussstroms I'_{sc} (in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) nutzen.

$$I'_{sc} = \frac{V_{te}}{R_{te}} \quad \text{Formel 2}$$

R_{te} = Widerstand in Ω , V_{te} = transepitheliale Spannung in V, I'_{sc} = äquivalenter Kurzschlussstrom in A

2.5.3 Versuchsdurchführung

Für die Versuchsdurchführung wurde das Zellmodell einer Hauptzelle des Sammelrohrs zugrunde gelegt. Abbildung 10 zeigt ein Schema für die trans- und parazellulären Transportwege, die für Hauptzellen des Sammelrohres angenommen werden [32] (Vgl. Abbildung 6). Der Ionentransport in diesem Teil des Nephrons lässt ein lumen negatives transepitheliales Potential erwarten, das durch den Natriumkanalhemmstoff Amilorid auf nahezu 0 mV gebracht werden kann. Vor, zwischen und nach den eigentlichen Messungen wurde regelmäßig ein leerer, kollagen-beschichteter Filter in die Kammer eingesetzt um den Null-Wert und den Leerwiderstand des Systems zu bestimmen

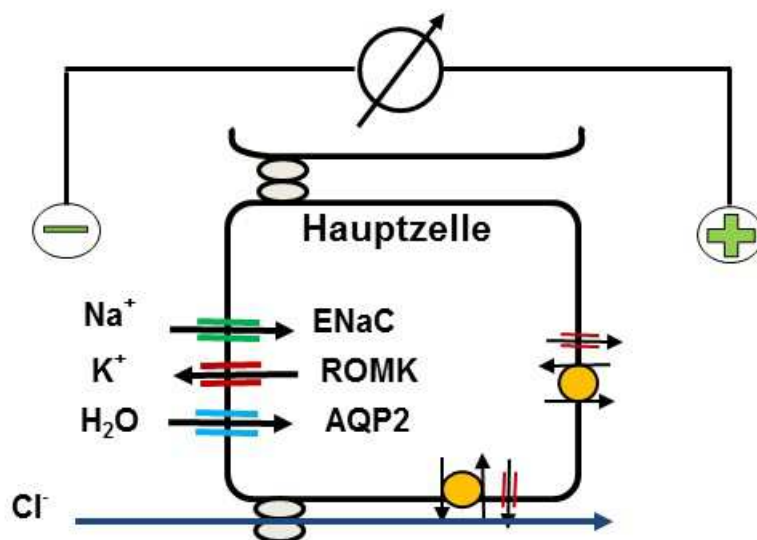


Abbildung 10: Zell- und Transportmodell einer Hauptzelle des Sammelrohrs. Symbole und Farbkodierung wie in Abbildung 6.

Das Messprotokoll ist in Abbildung 11 anhand einer Originalschreiberaufzeichnung exemplarisch dargestellt. Der in die Ussing Kammer eingespannte Filter wurde zunächst sowohl auf der luminalen als auch auf der basolateralen Seite für ca. 1- 4 Minuten von der jeweiligen Kontrolllösung umspült. Im Anschluss wurde in Kontrolllösung 50 μM Amilorid auf der luminalen Seite zugegeben, um den *transzellulären* Transport über den epithelialen Na^+ -Kanal ENaC zu hemmen und den durch Amilorid hemmbaren Strom $\Delta I'_{sc}$ berechnen zu können. Ein in dieser Situation über das Epithel angelegter Konzentrationsgradient für NaCl führt zu Potentialänderungen, die durch *parazelluläre*

Ionenbewegungen von Na^+ und Cl^- durch die im Fokus stehenden TJs hervorgerufen werden, sogenannte Dilutions- oder Diffusionspotentiale. Nach ca. 50 - 80 s Spülung mit amiloridhaltiger Kontrolllösung auf der luminalen Seite wurde für ebenfalls 50 - 80 s zunächst auf der luminalen Seite die mit Amilorid versetzte Niedrig-Natrium Lösung ein- und wieder ausgewaschen. Das unmittelbar nach Einwasch entstehende Diffusionspotential wurde nach kurzer Stabilisierung abgelesen. Der Auswasch fand bis zum Wiedererlangen eines stabilen Potentials erneut mit amiloridhaltiger Kontrolllösung statt. Für weitere 50 - 80 s erfolgte die Anlage des NaCl Konzentrationsgradienten auch auf der basolateralen Seite, wo ein spiegelbildliches Diffusionspotential abgelesen werden konnte. Nach basolateralem Auswasch der Niedrig-Natriumlösung wurde auch luminal das Amilorid ausgewaschen und am Ende konnte erneut das unter Kontrollbedingungen generierte Potential des vitalen Epithels beurteilt werden. Eine Messung nach diesem Messprotokoll dauerte pro Filter ungefähr 10-12 Minuten.

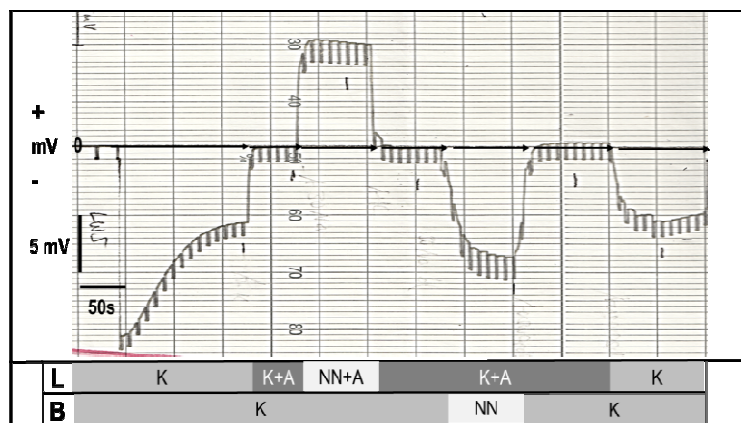


Abbildung 11: Messprotokoll anhand einer originalen Schreiberaufzeichnung (L=luminale Lösung, B=basolaterale Lösung, K=Kontrolllösung, NN=Niedrig-Natriumlösung, +A = +50 μM Amilorid zugesezt).

Abbildung 12 veranschaulicht das Analyseverfahren an einer Original-Messaufzeichnung. V_{te} wurde zwischen Null-Wert der Kammer mit Leerfilter und der Schreiberaufzeichnung bestimmt. ΔV_{te} wurde wie eingezeichnet bestimmt.

Als Einschlusskriterium für die Auswertung des gemessenen Filters wurde festgelegt, dass das luminal Diffusionspotential innerhalb von ≤ 27 s und das basolaterale Diffusionspotential innerhalb von ≤ 45 s einen Wert erreichen musste, der im Verlauf nicht mehr als 20 % variieren durfte. Die für die basolaterale Seite geltende höhere Einwaschdauer ergibt sich aus der Tatsache, dass die Lösung auf dieser Seite zunächst die Löcher des Filters überwinden musste.

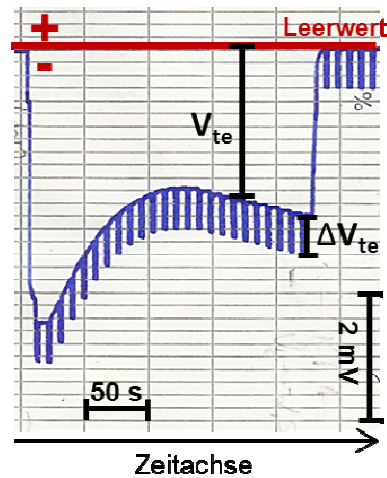


Abbildung 12: Original-Aufzeichnung einer Messung mit Darstellung des Analyseverfahrens.

2.5.4 Permeabilitäten

Je nach Ionenbeweglichkeit und Zusammensetzung der TJ lässt sich mittels des abgelesenen Diffusionspotentials eine Aussage über die Präferenz der TJ für Anionen oder Kationen treffen.

2.5.5 Liquid Junction Potentiale

Der Systemaufbau für die Bestimmung der Diffusionspotentiale mit asymmetrisch anliegenden NaCl-Lösungen führt zu so genannten ‚Liquid Junction Potentialen‘ (LJP), die überall dort entstehen können, wo es Grenzflächen zwischen zwei Lösungen mit unterschiedlicher Zusammensetzung der enthaltenen Elektrolyte gibt. Die Messwerte müssen um die so entstehenden Spannungen korrigiert werden. Relevante Variablen sind neben der Ionenaktivität auch die Ionenmobilität sowie die Ionenladung.

Im konkreten Fall betrifft das insbesondere die beiden Agarbrücken der Messelektroden, bestehend aus 2,5 % Agar-Agar in 1 M KCl und die vorbeifließenden Messlösungen (Kontrolllösung und jeweilige Niedrig-Natrium Lösung). Die perfundierende Lösung steht sowohl auf der luminalen als auch auf der basolateralen Seite in einem ständigen Austausch mit der Agarbrücke und dem enthaltenen KCl.

Die Grenzfläche, die bei leckem Epithel potentiell auf Ebene des Filterbodens zwischen luminaler und basolateraler Messlösung ein LJP generieren kann, wurde als vom Epithel dicht bewachsen gewertet, so dass hier das ausgewertete Diffusionspotential, nicht jedoch ein LJP entsteht. Das LJP lässt sich als theoretisch maximal mögliche Messwertabweichung berechnen und muss als

kombinierter Korrekturfaktor berücksichtigt werden. Hierfür wurde die Henderson Gleichung (aus [20]) verwendet.

$$\Delta_{\phi \text{diff}} = -\frac{R * T}{F} * \frac{\sum_i (a_{i1} - a_{i2}) * u_i * |z_i|}{\sum_i (a_{i1} + a_{i2}) * u_i * |z_i|} * \ln \frac{\sum_i (a_{i1}) * u_i * |z_i|}{\sum_i (a_{i2}) * u_i * |z_i|} \quad \text{Formel 3}$$

$\Delta_{\phi \text{diff}}$ = Potentialdifferenz (LJP); R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur; F = Faraday Konstante; a_{i1} = Aktivität von Ion i in Lösung 1; a_{i2} = Aktivität von Ion i in Lösung 2; u_i = absolute Mobilität von Ion i ; z_i = Ladungszahl von Ion i .

Tabelle 2 zeigt die Werte, die für die Ionenmobilitäten aus der Literatur entnommen wurden [3, 45].

Tabelle 2: Ionenmobilitäten bei 25 °C [3, 45]

Ion	Ladung	Mobilität [$10^{-8} \frac{m^2}{Vs}$]
Cl ⁻	-1	7.91108
K ⁺	1	7.62000
Na ⁺	1	5.19684
Mg ²⁺	2	2.75082
H ₂ PO ₄ ⁻	-1	3.42900
HPO ₄ ²⁻	-2	2.97180
Ca ²⁺	2	3.08458
Gluconat ⁻	-1	2.51460
HCO ₃ ⁻	-1	2.51460

Da im zuvor beschriebenen Ussing Kammer Aufbau luminal und basolateral ein LJP zwischen Agarbrücke und Messlösung entstehen kann, ergibt sich als Korrekturwert eine Kombination aus zwei errechneten Werten.

Tabelle 3 zeigt die entsprechenden Werte, die bei der Auswertung berücksichtigt werden mussten.

Tabelle 3: LJP Korrekturwerte für die verwendeten Experimentallösungen

Korrekturwert, der vom Messwert subtrahiert wird [mV]				
	luminal	basolateral	luminal	basolateral
Osmolalität	Niedrig-Natrium	Kontrolllösung	Kontrolllösung	Niedrig-Natrium
300	1,79		-1,79	
600	2,14		-2,14	
900	2,39		-2,39	

2.5.6 Berechnung der Permeabilitäten für Natrium und Chlorid

Die Berechnung von Permeabilitäten abgeleitet von den gemessenen Diffusionspotentialen gelingt unter Anwendung der modifizierten Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung [16].

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{[Cl]_l - e^{\frac{V \cdot F}{R \cdot T}} [Cl]_b}{e^{\frac{V \cdot F}{R \cdot T}} [Na]_l - [Na]_b} \quad \text{Formel 4}$$

P_i = Permeabilität für das Ion i ; V = Messwert für das Diffusionspotential in V; F = Faraday-Konstante $96485,3 \frac{C}{mol}$; R = allgemeine Gaskonstante $8,31451 \frac{J}{mol \cdot K}$; T = Temperatur, 310 K; $[i]_l$ = Konzentration des Ions i auf der luminalen Seite; $[i]_b$ = Konzentration des Ions i auf der basolateralen Seite.

Auch die absoluten Permeabilitäten der TJ für Na^+ und Cl^- lassen sich berechnen. Für die Berechnung der absoluten Natriumpermeabilität P_{Na} wurde die vereinfachte Formel nach Kimizuka-Koketsu verwendet [29, 30].

$$P_{Na} = \frac{G * \left(\frac{R * T}{F^2} \right)}{\alpha * (1 + \beta)} \quad \text{Formel 5}$$

P_{Na} = Permeabilität für Na^+ ; G = Leitfähigkeit; α = Aktivität von Na^+ ; β = Permeabilitätsquotient $\frac{P_{Cl}}{P_{Na}}$; Konstanten siehe auch Beschriftung zu Formel 4

Unter Berücksichtigung der Oberflächengröße, wird G als Leitfähigkeit auf diese bezogen.

$$G = \frac{1}{R_{te}} \quad \text{Formel 6}$$

R_{te} = transepithelialer Widerstand

Die Formel lässt sich also auch schreiben als

$$P_{Na} = \frac{1}{R_{te}} * \frac{R * T}{F^2} \frac{1}{a_{Na^+} * \left(1 + \left(\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} \right)^{-1} \right)} \quad \text{Formel 7}$$

P_{Na} = Permeabilität für Na^+ ; R_{te} = transepithelialer Widerstand; $\frac{P_{Na}}{P_{Cl}}$ = zuvor berechneter Permeabilitätsquotient; Konstanten siehe auch Beschriftung zu Formel 4

Die Permeabilität für Chlorid P_{Cl} lässt sich unter Kenntnis der Natriumpermeabilität nach Kimizuka-Koketsu wie folgt berechnen [30]:

$$P_{Cl} = P_{Na} * \beta \quad \text{Formel 8}$$

$$\beta = \frac{P_{Cl}}{P_{Na}}, \text{ siehe hierzu auch Formel 5}$$

2.6 Elektrolytmessungen

An Tag 6 oder 7 der Kulturzeit wurden die Überstände des Kulturmediums nicht verworfen, sondern bei -20°C aufbewahrt, um sie für Elektrolytmessungen zu verwenden. Dabei wurde der Gehalt von Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionen im luminalen und basolateralen Medium flammenphotometrisch gemessen (EFOX 5053 Flammenphotometer, Eppendorf). Die Unterschiede in luminaler und basolateraler Konzentration der einzelnen Ionen erlauben eine Aussage über mögliche Transportvorgänge des Zellverbandes. Dabei wurden die höher osmolaren Mediumüberstände verdünnt, um im Messbereich des Flammenphotometers zu bleiben.

2.7 Immunfluoreszenz

Die funktionellen Ergebnisse aus den Ussing Kammer Versuchen sollten um mögliche morphologische Korrelate an den TJs der IMCD Zellen ergänzt werden. Hierzu wurden spezifische Primärantikörper gegen verschiedene Claudine oder ZO-1 verwendet, die durch fluoreszierende Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden konnten. Um über weitere Eigenschaften urteilen zu können, wurden Ko-Färbungen durchgeführt, zum einem mit dem β -Aktin Zytoskelettmarker Phalloidin, und zum anderen mit Antikörpern gegen AQP2 (Aquaporin 2) oder AE1 (Anion Exchanger 1).

Als eine Referenz für die in Primärzellkulturen gefärbten Proteine wurde eine Rattenniere perfusionsfixiert, um an einem *in vivo* Modell die Zellen des Sammelrohrs für dieselben Proteine zu charakterisieren.

2.7.1 Fixierung

Der Filter mit Primärkulturzellen wurde nach dem Ussing Kammer Versuch mit $50 \mu\text{l}$ 0,4 % PFA (Paraformaldehyd in PBS) über Nacht bei 4°C fixiert.

Die Organfixierung der Niere erfolgte am tief narkotisierten Tier (5 Vol% Isofluran) über einen Flankenschnitt und direkten Zugang zur linken Nierenarterie mittels Injektion von 4 % PFA (in PBS). Die Ratte wurde zuvor exsanguiniert. Das Organ wurde entnommen, dekapsuliert und in Keile geschnitten, die dann zum Nachfixieren für 2-3 h in 4 % PFA überführt wurden. Im Anschluss daran

wurden die Keile in 20 % Saccharose-Lösung eingelegt, über Nacht darin belassen und in speziellem Einbettmedium mit Frostschutz in Aluförmchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sie konnten dann bei -80°C gelagert werden. Schnittpräparate wurden bei -20°C im Cryostat (Leica CM 3050) in 3 µm und 10 µm Dicke angefertigt und auf polylysinbeschichtete Objektträger (OT) verbracht. Sie wurden bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor der Färbung erfolgten zunächst zwei Antigen-Demaskierungsschritte. Zuerst wurden die Schnitte in einer Standküvette mit eiskaltem Methanol/Aceton (7:3) bei -20°C für 10 min inkubiert. Nach einem Waschschrift mit destilliertem Wasser wurden die auf OTs befindlichen Schnitte in Citratpuffer (10 mM Citronensäuremonohydrat, pH 6) \geq 5 min sprudelnd gekocht. Dadurch sollten die Antigene für die Antikörper besser zugänglich gemacht werden.

2.7.2 Färbung der Filter und Nierenschnitte

Nach Waschschriften mit PBS und PBS-T (0,3 % Triton in PBS, 3 x 10 min) wurden Filter und Nierenschnitte mit dem Primärantikörper gegen das entsprechende Protein über Nacht in PBS-T mit 1 % BSA (Bovines Serumalbumin, Serva) bei 4°C inkubiert. Tabelle 4 zeigt eine Liste aller verwendeten Primärantikörper. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde der ungebundene Primärantikörper abgewaschen (3 x 10 min mit PBS-T). Der Sekundärantikörper in PBS-T verblieb für 60 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit auf Filter und Nierenschnitten und wurde anschließend abgewaschen (3 x 10 min mit PBS-T).

Tabelle 4: Liste der verwendeten Primärantikörper

Antigen	Wirtstier	Verdünnung	Herkunft
Ratte AE1	Kaninchen	1:500	AG Loffing, Zürich ¹
Ratte AE1	Meerschweinchen	1:200-1:500	AG Loffing, Zürich ¹
Ratte AQP2	Kaninchen	1:100	Alomone Labs
Ratte Claudin 15	Maus	1:300	Hou, J. ²
Ratte Claudin 19	Kaninchen	1:300	Hou, J. ²
Ratte Claudin 8	Kaninchen	1:300	Hou, J. ²
Ratte Claudin 10	Maus	1:300	Hou, J. ²
Ratte Pendrin	Kaninchen	1:500	AG Loffing, Zürich ¹
Ratte β -Enac Ib2	Kaninchen	1:10000	AG Loffing, Zürich ¹
Ratte ZO-1	Kaninchen	1:500-1:1000	AG Schlatter, Münster ³
Ratte H+ATPase	Kaninchen	1:800	AG Schlatter, Münster ³

¹ Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der AG Loffing (Anatomische Institut, Zürich)

² Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Hou (Washington University Renal Division, St. Louis, MO, USA)

³ Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der AG Schlatter (Experimentelle Nephrologie, Uniklinikum Münster)

Die Filtermembran wurde aus dem Einsatz herausgebrochen und auf einen OT gelegt. Sowohl die Filtermembran als auch die Nierenschnitte wurden mit einigen Tropfen Eindeckmedium (Mowiol-Dapko, Carl Roth, mit DAPI (1:1000), Fluka) und je einem Deckglas eingedeckt.

In Tabelle 5 sind die markierten Sekundärantikörper aufgelistet.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Antigen	Wirtstier	Verdünnung	Herkunft	Anregung [nm]
Kaninchen IgG	Ziege	1:500	Thermo Scientific	633
Maus IgG	Ziege	1:500	Life Technologies	488
Meerschweinchen IgG	Ziege	1:500	Life Technologies	488
Maus IgG	Esel	1:500	Life Technologies	594
Kaninchen IgG	Esel	1:500	Life Technologies	488
β -Aktin ¹		1:1000- 1:2000	AG Schlatter, Münster ¹	488
β -Aktin ¹		1:1000- 1:2000	AG Schlatter, Münster ¹	594

¹ β -Aktin wurde mit Alexa Dye gekoppeltem Phalloidin angefärbt, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der AG Schlatter (Experimentelle Nephrologie, Uniklinikum Münster)

2.7.3 Auswertung

Die Auswertung erfolgte zum einen konfokal an einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510, Zeiss) entweder bei Anregungswellenlängen von 488 nm (Hauptfarbteiler 488; Band Pass Filter 505-530) oder 633 nm (Hauptfarbteiler 488; Nebenfärbteiler 635 *visible*; Long Pass Filter 650), wobei die Schichtdicke der konfokal aufgenommenen Bilder 1-3 μ m betrug.

Jeder Filter wurde zunächst in der Übersicht auf Vollständigkeit und Regelmäßigkeit des Zellrasens untersucht. Morphologische Färbungen wie z.B. die Phalloidin Färbung ermöglichten die vergleichende Beurteilung von Zellgröße und -form. Färbungen von Claudinen wurden in Bezug zur interzellulären TJ als vesikulär, submembranär oder membranär eingestuft und unter den drei Gruppen statistisch verglichen. Dafür wurde der Filter sorgfältig durchmustert, um das hauptsächlich vorliegende Verteilungsmuster möglichst korrekt zu erfassen. Jede Primärkultur von IMCD-Zellen besaß einen Anteil an innermedullär ebenfalls vorkommenden dünnen Schleifen (engl.: *thin limbs*, TL). Deren Vorliegen wurde quantifiziert, indem aus 4 Gesichtsfeldern ein Durchschnittswert für die von Schleifenzellen bewachsene Fläche gebildet wurde.

Die Claudin-19-Verteilung auf IMCD-Filtern wurde anhand der Lokalisation in Bezug zur Zellmembran als vesikulär, submembranär und membranär charakterisiert. Jede dieser Kategorien erhielt eine Zahl: 1 für vesikulär, 2 für submembranär und 3 für membranär. Dabei wurde jeder Filter in 4 Quadranten eingeteilt und jeder Eigenschaft ein Prozentwert zugeordnet, einer Präzision von 25 % entsprechend. Anschließend wurden den Filtern Scores zugewiesen indem der Prozentsatz an vesikulärer Färbung mit 1, der der submembranären Färbung mit 2 und der der membranären Färbung

mit 3 multipliziert und dann diese Produkte summiert wurden. Damit ergibt sich, dass je mehr Claudin-19 direkt in der Membran vorliegt desto höher der errechneten Score, Abbildung 13.

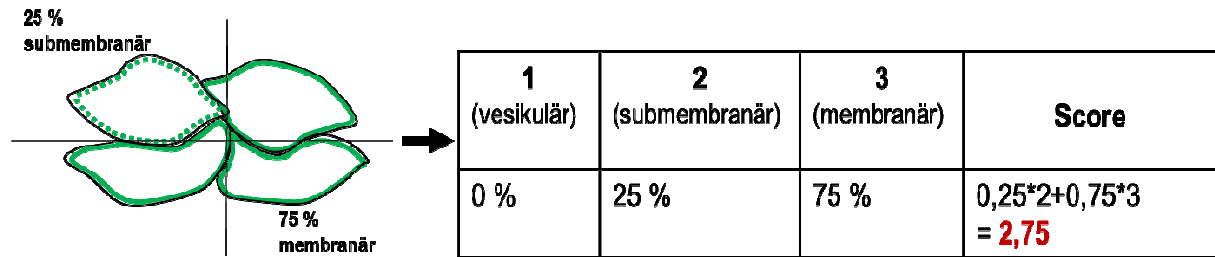


Abbildung 13: Auswertung der Claudin-19-Lokalisation und Bildung eines Scores zur Vergleichbarkeit der Filter untereinander

Im Nierenschnitt wurde der Fokus hauptsächlich auf die Sammelrohre gerichtet. Sie wurden unter anderem auf die Existenz der in der Primärkultur nachgewiesenen Claudine untersucht. Auch das Vorliegen und die Konfiguration anderer Claudine sollten eine nähere Charakterisierung der innermedullären Sammelrohre ermöglichen.

2.8 FITC-Dextran-Messungen

Der mit Primärzellen bewachsene Filter wurde auf die Durchgängigkeit für Makromoleküle untersucht. 40 kDa Dextran mit daran gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-isothiocyanat (FITC-Dextran 40 kDa, FD40S Sigma-Aldrich) wurde im luminalen Kompartiment des Filters vorgelegt und das Auftreten im basolateralen Kompartiment nach definierten Zeitabständen als Fluoreszenzsignal detektiert. Es wurde je eine 10-fach konzentrierte Stammlösung mit definierter FITC-Dextran Menge ($10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ DMEM) angefertigt. Die Konzentration der Arbeitslösung entsprach demnach $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$. Das entspricht einer 25 μM Dextran-Lösung, bzw. ca. 62 μM FITC, wenn man von einer mittleren FITC-Konjugation von 0,01 Mol FITC/Mol Glukosemolekül (Sigma: 0,003-0,02) und ca. 62 Glukosemolekülen pro 10.000 kDa Dextran ausgeht.

Die Exzitationswellenlänge für FITC beträgt 485 nm, die Emissionswellenlänge 535 nm.

2.8.1 Dialyse

Um freies FITC aus der Stammlösung zu eliminieren, wurde diese in einem Dialyseschlauch (ZelluTrans 10 mm, Roth) umgeben von entsprechendem Zellkulturmedium (DMEM) über Nacht dialysiert.

2.8.2 Versuchsdurchführung

Die Fluoreszenz Messungen wurden vor der Messung der Filter in der Ussing Kammer durchgeführt. Nach dem Mediumwechsel wurden luminal zunächst 270 μl Medium vorgelegt und mit 30 μl aus der FITC-Dextran Stammlösung ergänzt, sodass luminal eine FITC-Dextran Konzentration von 1 mg/ml vorlag. Im basolateralen Kompartiment wurden aufgrund der zu entnehmenden Probengrößen anstatt 600 μl 800 μl als Ausgangsvolumen gewählt. Zu den Zeitpunkten $t = t_{0 \text{ min}}$, $t = t_{30 \text{ min}}$ und $t = t_{60 \text{ min}}$ wurden aus dem basolateralen Kompartiment Proben von 200 μl entnommen und sofort nach Entnahme in einer 96-well Platte (FluoronuncTM/LuminuncTM, Nunc) in einem Tecan Genios (Tecan Group Ltd.) Plattenlesegerät bei Dunkelheit analysiert. Die Fluoreszenzintensität wurde als RFU (engl.: *relative fluorescence units*) gemessen und konnte mit Hilfe einer Eichreihe und unter Berücksichtigung der Volumenveränderung über die Zeit in Konzentrationen von FITC bzw. Dextran rückgerechnet werden.

2.8.3 Dextran Permeabilität

Die über das Epithel transportierte Stoffmenge Dextran J_{Diff} wurde nach Formel 9 berechnet.

$$J_{\text{Diff}} = \frac{\Delta c}{\Delta t} * V \quad \text{Formel 9}$$

Δc in [nmol/l] bezeichnet den basolateralen Konzentrationsunterschied zweier Messzeitpunkte mit dem Zeitabstand Δt in [s]; V ist das Volumen in [l], auf das sich die Konzentration bezieht.

J_{Diff} war insgesamt so klein, dass die luminal Konzentration im Zeitraum Δt als konstant angenommen werden konnte. Unter Verwendung von Formel 9 lässt sich die Permeabilität als Geschwindigkeit der Dextrandiffusion über das Epithel wie folgt berechnen:

$$P = \frac{J_{\text{Diff}}}{A * \Delta c'} \quad \text{Formel 10}$$

A ist die Fläche in [cm^2]; $\Delta c'$ bezeichnet den Konzentrationsunterschied zwischen luminaler und basolateraler Seite [nmol/cm^3]

Die Dextranpermeabilität über ein Epithel aus IMCD-Zellen wurde mit der Dextranpermeabilität über den jeweiligen Leerfilter verglichen. Für jede Osmolarität wurde ein eigener Leerfilter einbezogen, da die unterschiedlich osmolaren Kulturmedien auch unterschiedliche Basis RFU-Werte aufwiesen.

2.9 Statistische Datenanalyse

Als Analysesoftware wurde Excel 2010 (Microsoft, US) und GraphPadPrism 7.00 verwendet. Für alle statistischen Stichprobenvergleiche wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% als Signifikanzniveau festgelegt.

Aufgrund der insgesamt geringen Stichprobengrößen, wurde für alle experimentell erhobenen Daten angenommen, dass sie aus einer normalverteilten Grundgesamtheit gezogen wurden. In allen normalverteilten Stichproben wurde das arithmetische Mittel und der Standardfehler des Mittelwerts gebildet. Die graphische Darstellung erfolgt in Diagrammen als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM = engl.: *standard error of the mean*).

Um drei Gruppen untereinander zu vergleichen, wurde eine ANOVA-Analyse verwendet, mit anschließendem Tukey-Test als Post-hoc Test zum Einzelvergleich verwendet. Zwischen zwei Gruppen ein zweiseitiger 2-Stichproben-t-Test.

Zum statistischen Vergleich der Claudin-19-Verteilung wurden die Gruppen mit einer nominalen Statistik (Kruskal-Wallis-ANOVA) auf ihre Unterschiede getestet. Diese Daten wurden als Box-Whisker-Plot veranschaulicht.

Signifikante Unterschiede sind im Folgenden durch Verbundstriche zwischen den Gruppen sowie durch die Angabe eines „*“ gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der Osmolalität des Kulturmediums auf die Größe und Morphologie der Zellen

Zunächst wurden die Primärzellkulturen der inneren Medulla auf grob auffällige morphologische Unterschiede hin untersucht. Dazu wurden die auf Glas ausgesäten Zellen im Transmissionslicht betrachtet und exemplarisch fotografiert. Es zeigten sich unter allen Kulturbedingungen nach 7 Tagen in Kultur polygonale, im dichten einschichtigen Zellverband zusammenhängende, epitheliale Zellen (Abbildung 14) ohne große Unterschiede in Wachstum und Aussehen der Zellen zwischen den Kulturen.

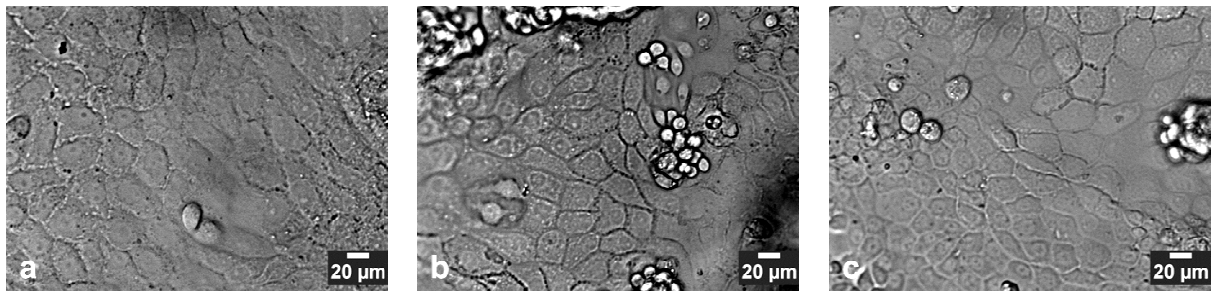


Abbildung 14: Transmissionsbilder nach 7 Tagen Kultur bei 300 (a), 600 (b) und 900 (c) mosm/kg: Abgebildet sind exemplarische Bildausschnitte, die homogen zusammenhängende Zellverbände zeigen.

3.2 Transepithelialer Widerstand der IMCD-Filterkulturen im Verlauf der Zellkultur

Um die Bildung eines intakten, konfluenten Zellverbandes zu beurteilen und zu dokumentieren, wurde der transepitheliale Widerstand der sich ausbildenden Zellverbände täglich dokumentiert, Abbildung 15b. Hierbei ergaben sich zum einen ein Anstieg des Widerstands über die Dauer der Kulturzeit sowie signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturbedingungen. Während bei niedriger Osmolalität von 300 mosm/kg (300-IMCD-Zellen) ein Zellverband mit hohem Widerstand und einem Durchschnittswert von $575 \Omega \cdot \text{cm}^2$ an Tag 6 beobachtet werden konnte, wurde bei 900 mosm/kg zu keiner Zeit ein Wert über $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ generiert. Die durchschnittlichen Werte an Tag 6 bei 900 mosm/kg (900-IMCD-Zellen) betragen $36,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und bei 600 mosm/kg (600-IMCD-Zellen) $98,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, Abbildung 15a.

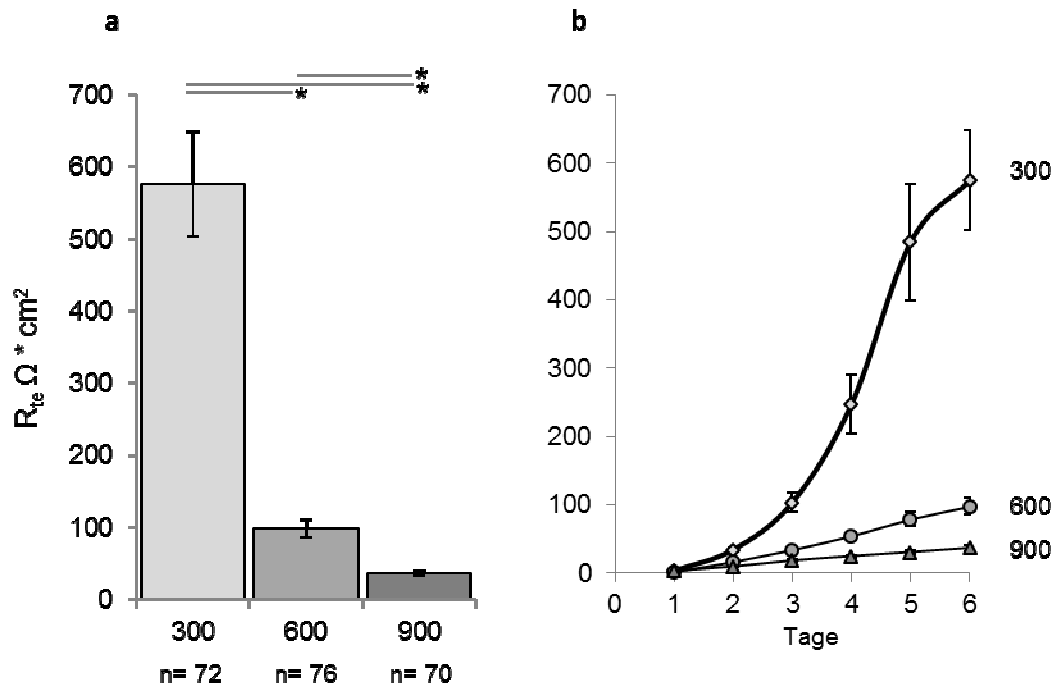


Abbildung 15: Transepithelialer Widerstand. Durchschnittlich gemessener Widerstand, die isolierte Betrachtung über die Zeit (b) sowie am Experimentiertag (a). Die tägliche Messung des transepithelialen Widerstandes ist in (b) aufgetragen. Am 6. Tag der Zellkultur vor den Ussingkammerexperimenten ergaben sich die in (a) gezeigten Widerstände. Die Zahlen 300, 600 und 900 stehen hier jeweils für 300-IMCD-, 600-IMCD- und 900-IMCD-Zellen und beziehen sich auf die Osmolalität des Zellkulturmediums in mosm/kg.

3.3 Elektrophysiologische Eigenschaften der IMCD-Filter-Zellen

Nach einer Kulturzeit von 6 bzw. 7 Tagen wurden die konfluent bewachsenen Filter in der Ussing Kammer vermessen, um genauen Einblick in die elektrophysiologischen Eigenschaften zu erlangen. Die Ergebnisse umfassen die elektrophysiologischen Grundeigenschaften wie das von den Zellen generierte transepitheliale Potential (V_{te}), den transepithelialen Widerstand (R_{te}), den äquivalenten Kurzschlussstrom (I_{sc}), den durch Amilorid hemmbaren Strom (ΔI_{sc}) sowie die aus den Diffusionspotentialen abgeleiteten Permeabilitäten für Na^+ - und Cl^- Ionen. So gelingt auf dieser Ebene eine Charakterisierung der transzellulären, ebenso wie eine indirekte Interpretation parazellulärer Transportwege. Es zeigte sich, dass die genannten trans- und parazellulären Kenngrößen des epithelialen Transportes größtenteils von der Osmolalität im umgebenden Milieu der IMCD-Zellen abhängig waren, Abbildung 16. Ein lumen negatives transepitheliales Potential (V_{te}), das in aktiv transportierenden Epithelien über die transzelluläre Resorption von Na^+ generiert wird, konnte nur bei 300-IMCD-Zellen beobachtet werden. Zusätzlich ergab sich in Konsistenz mit dieser Beobachtung ausschließlich für diese IMCD-Zellen der Hinweis auf einen durch Amilorid hemmbaren transzellulären Strom. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich hinsichtlich des transepithelialen

Potentials (V_{te}) und des äquivalenten Kurzschlussstroms (I'_{sc}) für 600-IMCD-Zellen und 900-IMCD-Zellen. Bei den IMCD-Zellen, die bei hoher Osmolalität (900 mosm/kg) kultiviert wurden, kam es unter Amilorid zur Entwicklung eines stärker negativen I'_{sc} , Abbildung 16d.

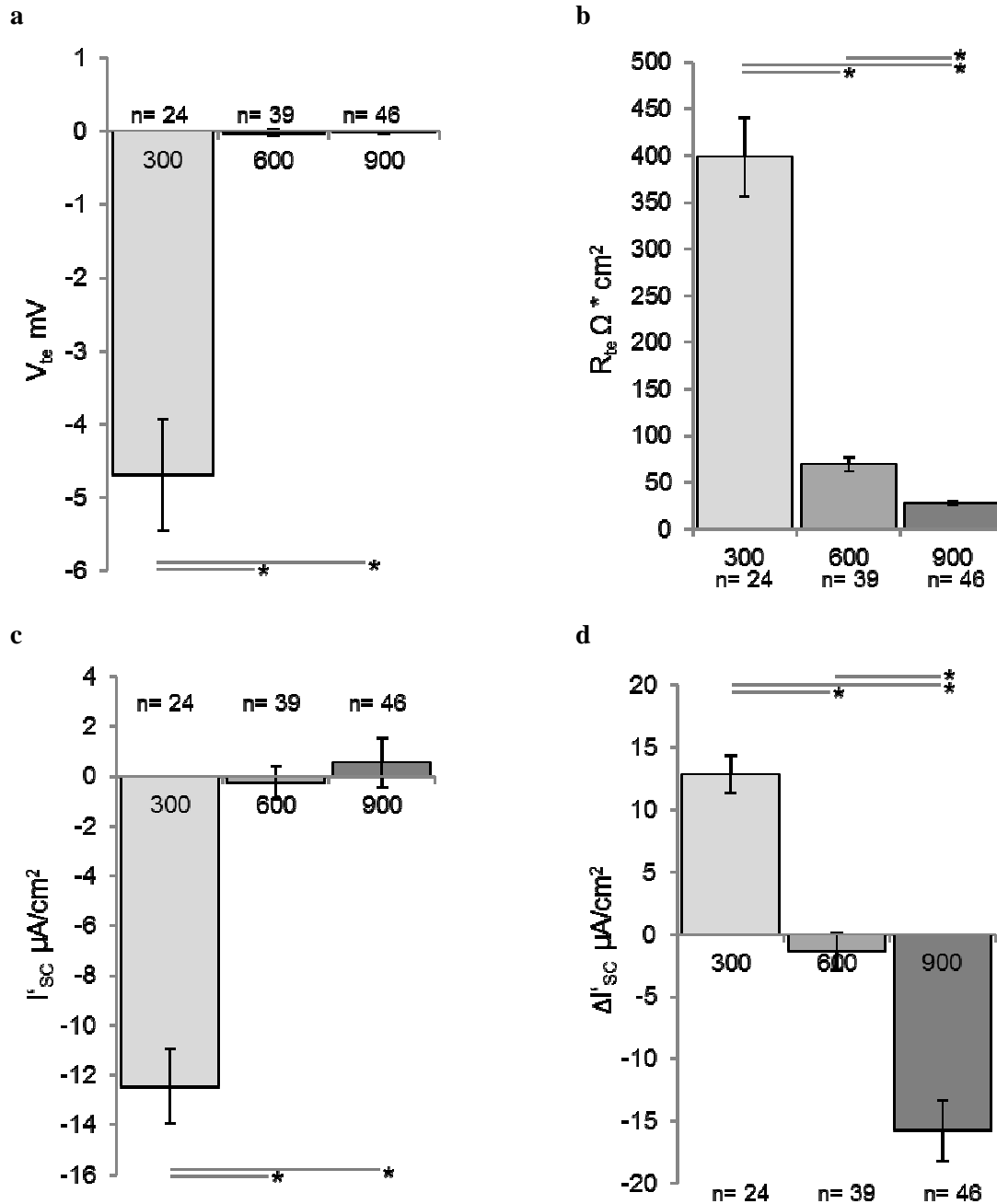


Abbildung 16: Kenngrößen des epithelialen Transports. Durchschnittliche Werte für das in der Ussing Kammer bestimmte transepitheliale Potential (V_{te}) (a), den transepithelialen Widerstand (R_{te}) (b), den Kurzschlussstrom (I'_{sc}) (c) und den durch Amilorid hemmbaren Strom ($\Delta I'_{sc}$) (d). Die Zahlen 300, 600 und 900 stehen hier jeweils für 300-IMCD-, 600-IMCD- und 900-IMCD-Zellen und beziehen sich auf die Osmolalität des Zellkulturmediums in mosm/kg.

Bei der Widerstandsmessung (Abbildung 16b) konnten die Befunde aus der Zellkultur begleitenden Messung bestätigt werden. Unter Plasma-isotonen Bedingungen (300 mosm) kultivierte Zellen zeigten den höchsten R_{te} ($398 \pm 42 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Dieser fiel bei steigender Osmolalität auf ein 14-fach niedrigeres Niveau von ungefähr $27 \pm 2,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bei 900 mosm.

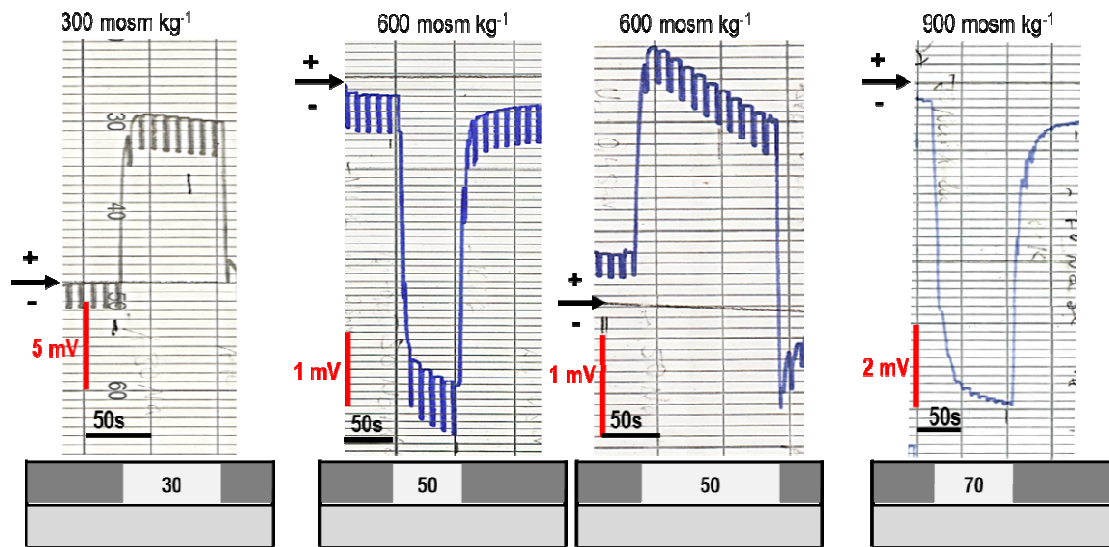
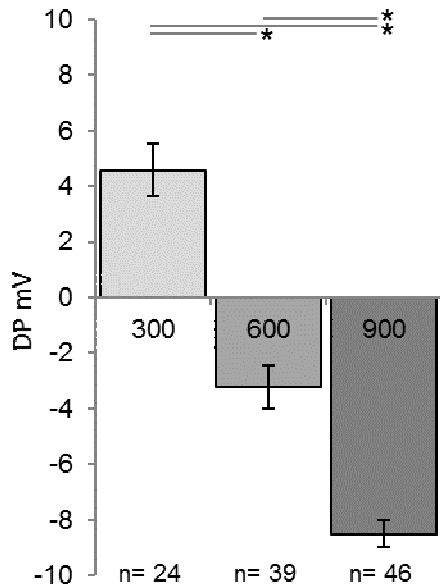


Abbildung 17: Repräsentative Diffusionspotentiale (DP) einzelner Filter bei Applikation der Niedrig-Natriumlösung auf der luminalen Seite. Die Zahlen 30, 50 und 70 stehen hier für die Konzentration von NaCl in mmol/l. Da bei 600-IMCD-Zellen sowohl negative als auch positive DP's gemessen werden konnten, sind hier exemplarisch 2 Filter aus der Gruppe der 600-IMCD-Zellen dargestellt. Zudem ist die unterschiedliche Schreiber-Verstärkung zu beachten. Die Zahlen 30, 50 und 70 stehen hier für die Konzentration von NaCl in mmol/l. Da bei 600-IMCD-Zellen sowohl negative als auch positive DP's gemessen werden konnten, sind hier exemplarisch 2 Filter aus der Gruppe der 600-IMCD-Zellen dargestellt. Zudem ist die unterschiedliche Schreiber-Verstärkung zu beachten.

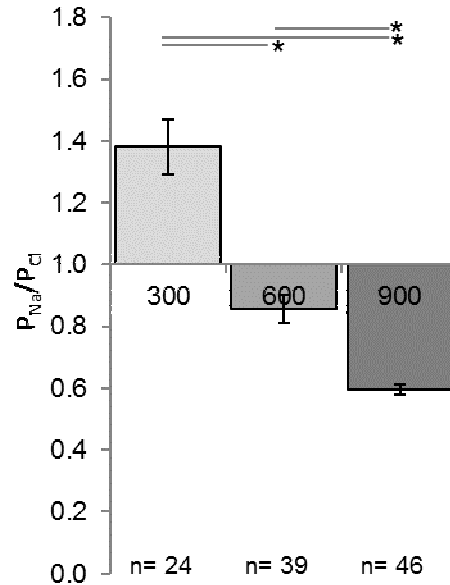
Auf parazellulärer Ebene änderten sich in Abhängigkeit von der Osmolalität die Präferenzen für Na^+ - und Cl^- -Ionen. Während die TJs der 300-IMCD-Zellendurchlässiger für Na^+ waren, waren sie bei den 600-IMCD-Zellen für beide Ionen ähnlich permeabel und bei den 900-IMCD-Zellen verschob sich diese Permeabilität in Richtung der Cl^- -Ionen, abzulesen an der Polarität der Diffusionspotentiale, Abbildung 17. Die parazellulären Eigenschaften der Zellen wurden durch hintereinander durchgeführte Wechsel auf niedrige NaCl-Konzentrationen ermittelt. Die Befunde wurden auf Symmetrie geprüft. Tatsächlich ergaben sich zwischen luminal und basolateral gemessenen und errechneten Werten für das Permeabilitätsverhältnis $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ sowie für die absoluten Permeabilitäten P_{Na} und P_{Cl} (Abbildung 18).

Luminaler Wechsel

a

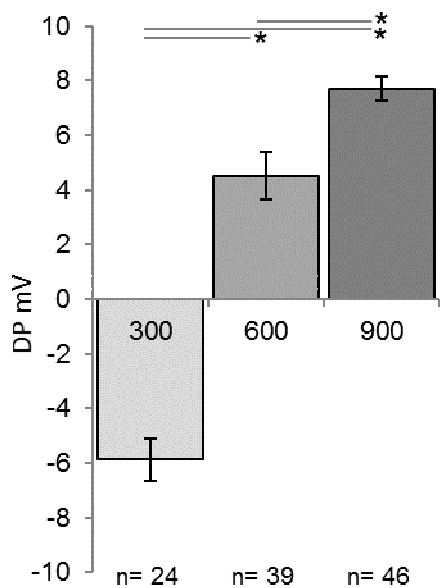


b



Basolateraler Wechsel

c



d

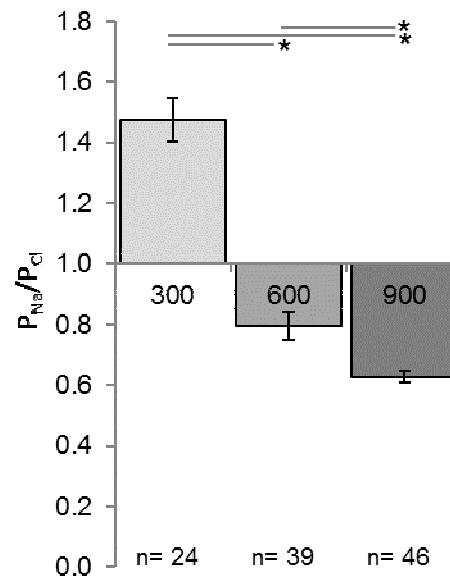
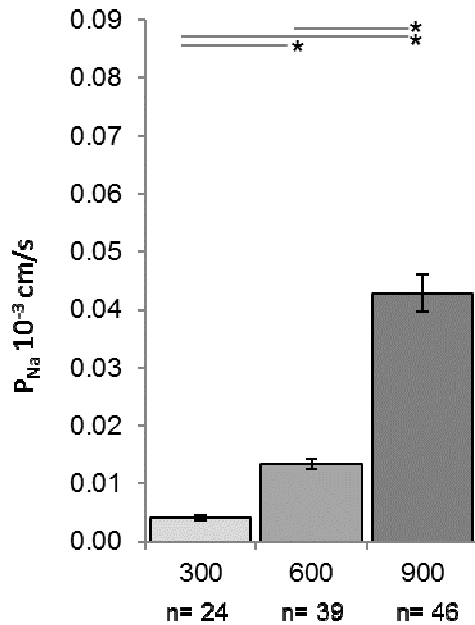


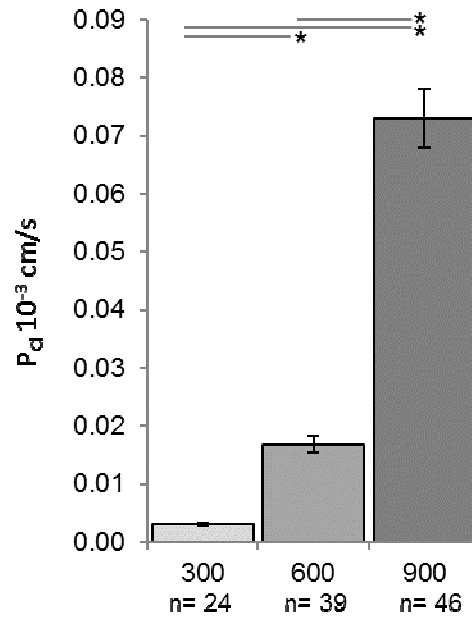
Abbildung 18: Diffusionspotentiale und Permeabilitäten. Durchschnittliche Werte für das in der Ussing Kammer bestimmte Diffusionspotential (DP) bei Applikation der Niedrignatrium-Lösung auf luminaler (a) und basolateraler (c) Seite. Permeabilitätsverhältnis von Natrium zu Chlorid (P_{Na}/P_{Cl}) bei luminalem (b) und bei basolateralem Wechsel (d). Die Zahlen 300, 600 und 900 stehen hier jeweils für 300-IMCD-, 600-IMCD- und 900-IMCD-Zellen und beziehen sich auf die Osmolalität des Zellkulturmediums in mosm/kg.

Luminal

a

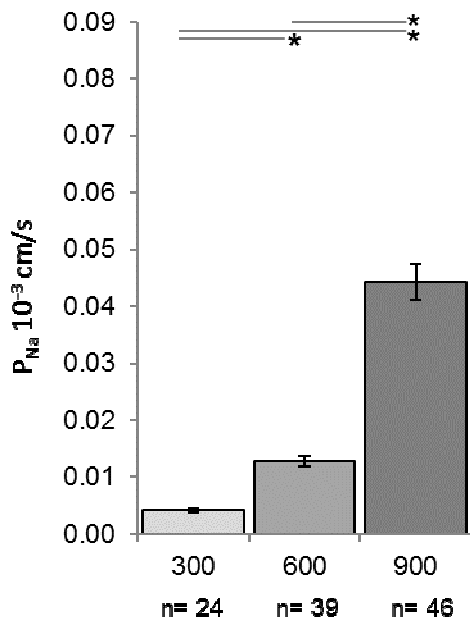


b



Basolateral

c



d

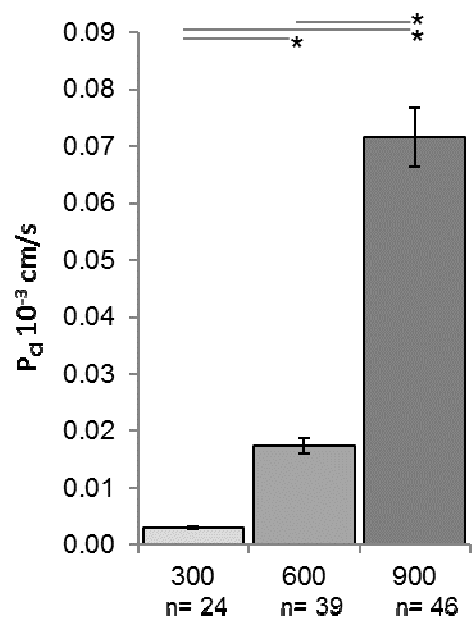


Abbildung 19: Absolute Natrium- und Chlorid-Permeabilitäten. Absolute Permeabilitäten für Natrium (P_{Na}) (a), (c) und Chlorid (P_{Cl}) (b), (d) luminal (a, b) sowie basolateral (c, d). Die Zahlen 300, 600 und 900 stehen hier jeweils für 300-IMCD-, 600-IMCD- und 900-IMCD-Zellen und beziehen sich auf die Osmolalität des Zellkulturmediums in mosm/kg.

3.4 FITC-Dextran Dichtigkeit der IMCD-Zellen

Als zusätzlicher Parameter um die Durchlässigkeit der verschiedenen IMCD-Kulturen zu messen wurden FITC-Dextran Messungen durchgeführt. Bei den Filtern, die auf ihre Permeabilität für 40 kDa

FITC-Dextran untersucht wurden, ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen 600-IMCD-Zellen und 900-IMCD-Zellen sowie zwischen 300-IMCD-Zellen und 900-IMCD-Zellen (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Die Permeabilität für Makromoleküle nahm mit steigender Osmolalität zu, war insgesamt aber jeweils ein Bruchteil der gleichzeitig am Leerfilter gemessenen Dextran-Permeabilität.

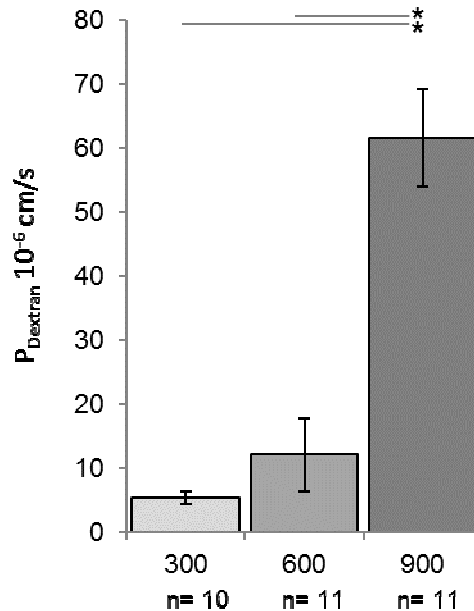


Abbildung 20: Permeabilität der IMCD-Zellen für Dextran. Die Zahlen 300, 600 und 900 stehen hier jeweils für 300-IMCD-, 600-IMCD- und 900-IMCD-Zellen und beziehen sich auf die Osmolalität des Zellkulturmediums in mosm/kg.

Für 300-IMCD-Zellen ergab sich eine 3000-fach niedrigere, für die 600-IMCD-Zellen eine 1000-fach niedrigere und für 900-IMCD-Zellen eine 500-fach niedrigere Dextran-Permeabilität im Vergleich zu den jeweils gemessenen Leerfiltern.

3.5 Elektrolytverschiebungen zwischen luminalem und basolateralem Kompartiment

Sekundär-aktiver Na^+ Transport von luminal nach basolateral, sowie eine entsprechende K^+ Sekretion kann durch Konzentrationsunterscheide im luminalen bzw. basolateralen Kompartiment der Zellkulturen nachgewiesen werden. Die Quantifizierung des Stofftransports differenzierter IMCD-Zellen gelang mittels flammenphotometrischer Elektrolyt- sowie Osmolalitätsmessung nach 24 Stunden Kultur (Tabelle 6). Wie schon in den Ergebnissen der Ussing Kammer-Messungen angedeutet, konnte das Zusammenspiel von Natriumresorption und Kalium-Sekretion, wie es für Hauptzellen vor allem des kortikalen Sammelrohrs angenommen wird, nur bei 300-IMCD-Zellen nachgewiesen werden. Nur hier kam es zu einem Abfall der luminalen Na^+ -Konzentration (Abbildung 21a). Die luminalen K^+ -Konzentration stieg in 300- und 600-IMCD-Zellen deutlich an. 900-IMCD-

Zellen zeigten dagegen einen deutlichen niedrigeren Konzentrationsunterschied für Kalium (Abbildung 21b).

Tabelle 6: Elektrolytmessungen nach 24 Stunden Kultur

	300 mosm/kg		600 mosm/kg		900 mosm/kg	
	luminal	basolateral	luminal	basolateral	luminal	basolateral
Natrium-Konzentration [mmol/l]						
n	45	45	51	51	54	54
Mittelwert	154.38	157.54	255.30	253.97	352.76	350.63
sem	0.72	0.64	1.07	1.06	1.26	1.44
Kalium-Konzentration [mmol/l]						
n	43	43	53	53	54	54
Mittelwert	5.98	5.37	5.68	5.16	5.56	5.36
sem	0.06	0.05	0.06	0.04	0.03	0.03
Osmolalität [mosm/kg]						
n	44	44	52	52	54	54
Mittelwert	345.02	348.14	630.81	627.31	915.07	909.02
sem	1.25	0.92	2.10	1.26	2.61	2.28

Angegeben sind die mittleren gemessenen Konzentrationen in mmol/l bzw. mosm/kg, sowie der Standardfehler. n bezeichnet die Anzahl der jeweils gemessenen Proben. Farbkodierung der Ionen wie in Abbildung 6.

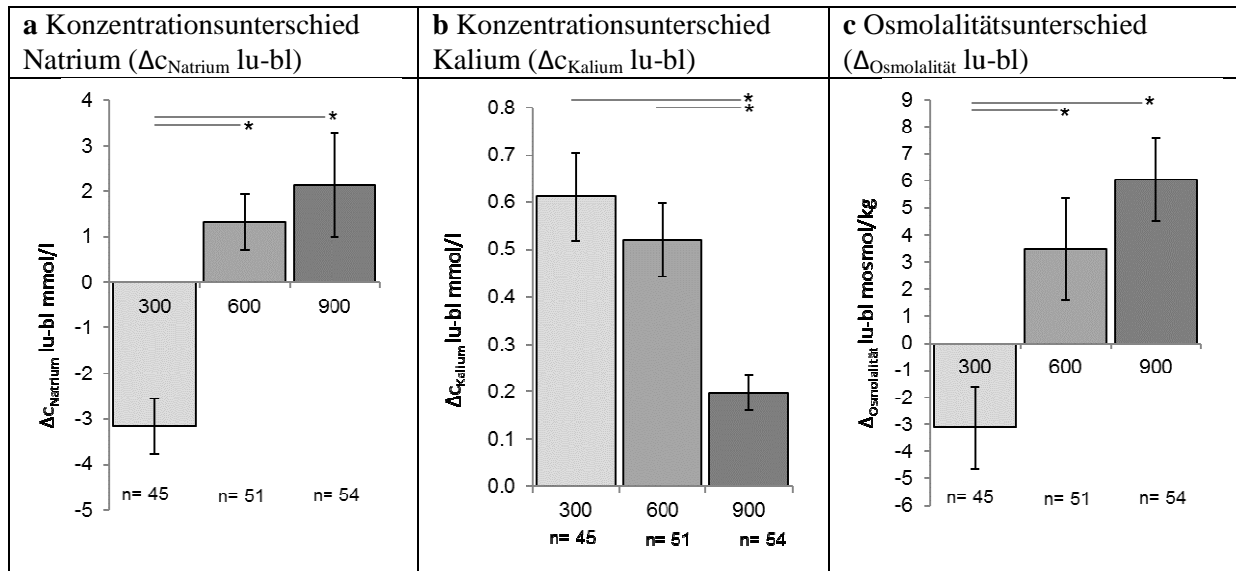


Abbildung 21: Elektrolytverschiebungen nach 24 Stunden Kultur. Graphische Darstellung der Konzentrationsunterschiede (Δc) für Natrium (a), Kalium (b) und die Osmolalität (c) zwischen luminalem (lu) und basolateralem (bl) Kompartiment.

3.6 Histomorphologische Verteilungsmuster in IMCD-Filterkulturen und Nierenschnitten

3.6.1 ZO-1

Als intrazellulärer integraler Bestandteil der Tight junction ließ sich das Zonula occludens-Protein 1 (ZO-1) in den TJs der IMCD-Zellen darstellen. ZO-1 ist unter anderem an der Verankerung der TJ am Zytoskelett beteiligt (siehe 1.1.2 Abschnitt Tight Junctions der Einleitung). In Abbildung 22 wird deutlich, dass Intensität und Linearität der Färbung mit steigender Osmolalität zunehmen, was einer Hyperosmolalitäts-assoziierten Hochregulation von ZO-1 entspricht, [50].

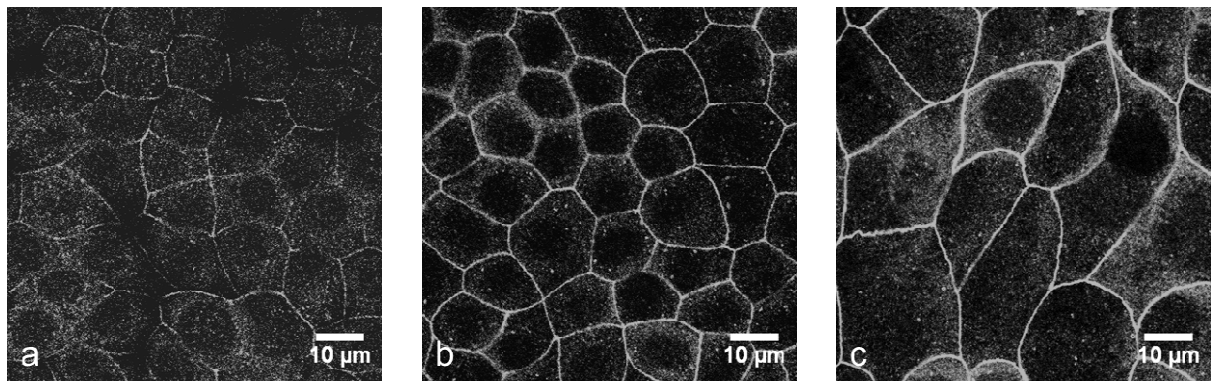


Abbildung 22: ZO-1 TJ Färbung bei 300-IMCD- (a), 600-IMCD (b) und 900-IMCD-Zellen (c)

3.6.2 Claudin 19 in IMCD-Filterkulturen und parallel gefärbten Nierenschnitten

Das eigentlich vornehmlich für die TAL beschriebene Claudin 19 konnte in allen IMCD-Zellen nachgewiesen werden.

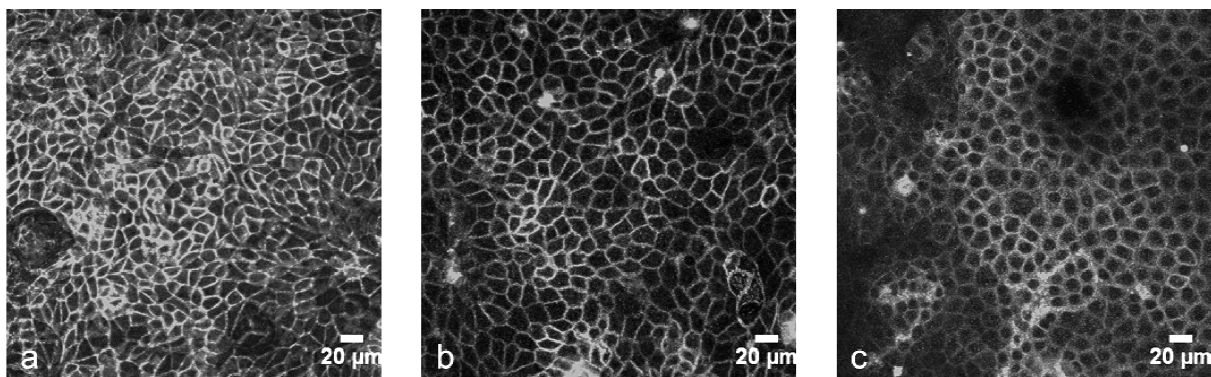


Abbildung 23: Claudin 19 Färbung bei 300-IMCD- (a), 600-IMCD- (b) und 900-IMCD-Zellen (c) in der Übersicht.

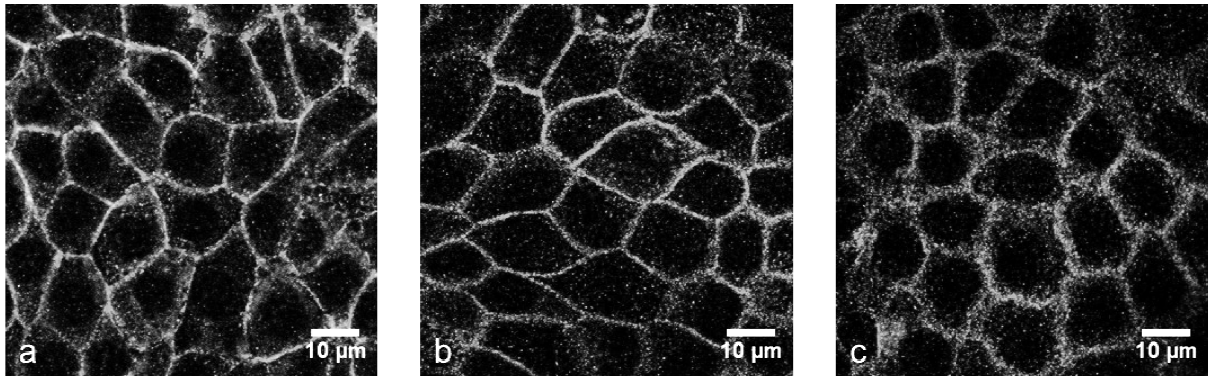


Abbildung 24: Claudin 19 Färbung bei 300-IMCD- (a), 600-IMCD- (b) und 900-IMCD-Zellen (c) in der Vergrößerung.

Bei der genaueren Betrachtung des interzellulären Verteilungsmusters zeigte sich, dass Claudin 19 in 300-IMCD-Zellen überwiegend membranär, in 600-IMCD-Zellen eher submembranär und in 900-IMCD-Zellen überwiegend vesikulär vorlag. Das ist bereits in Übersichtsaufnahmen zu erkennen (Abbildung 23) wird aber in Detailaufnahmen (Abbildung 24) noch deutlicher. Für Claudin 19 wurde zusätzlich jedem Filter ein Rang zugeordnet, je nachdem ob Claudin 19 eher membranär, (3), vesikulär (1) oder submembranär (2) vorlag. So gelang eine ergänzende semi-quantitative Analyse, Abbildung 25, mit signifikanten Unterschieden zwischen den 300-IMCD-Zellen und jeweils den 600- und 900-IMCD-Zellen.

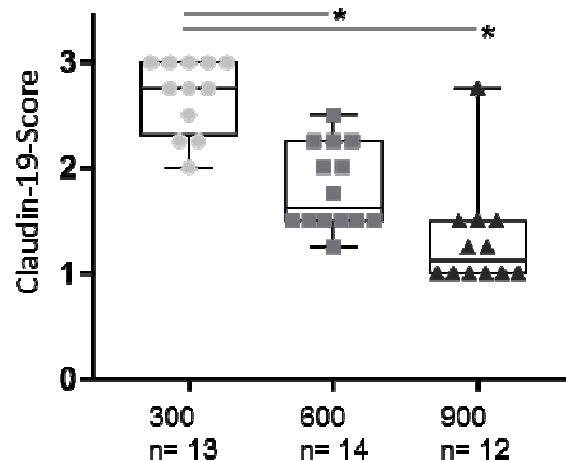


Abbildung 25: Darstellung der Claudin-19-Auswertung anhand eines Box-Whisker-Plots. Je näher an 3 der Score ausfiel, desto mehr Claudin 19 war membranär vorhanden. Mit steigender Osmolalität nahm die membranäre Verfügbarkeit bzw. Sichtbarkeit des Claudin-19 ab und der Score nahm wie abgebildet eher Werte um 1 (einer vesikulären Lokalisation entsprechend) an. Die Zahlen 300, 600 und 900 stehen hier jeweils für 300-IMCD-, 600-IMCD- und 900-IMCD-Zellen und beziehen sich auf die Osmolalität des Zellkulturmediums in mosm/kg.

Dass Claudin-19 immunhistochemisch auch im Sammelrohr der Rattenniere nachweisbar ist, zeigt Abbildung 26. Exemplarisch sieht man ein Sammelrohr der äußeren Medulla.

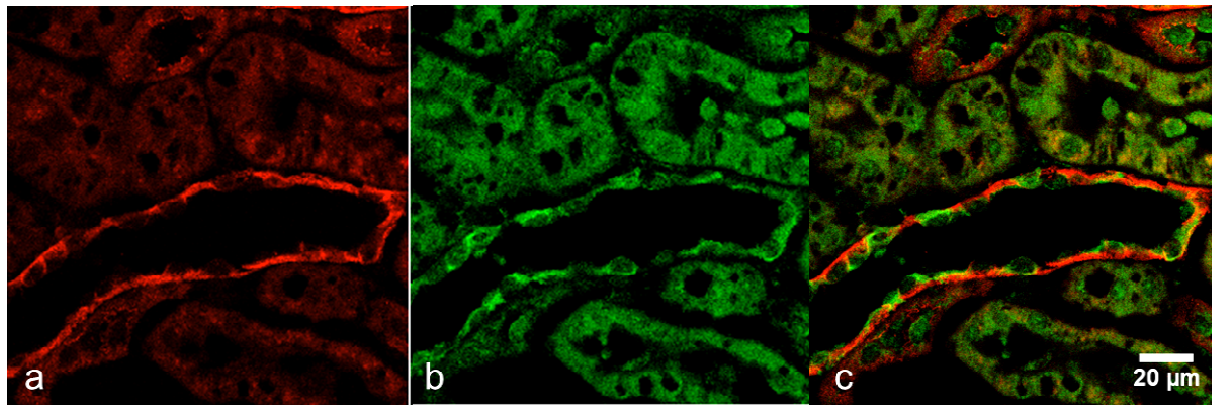


Abbildung 26: Claudin-19 (rot) und AE-1 (grün) als Sammelrohr- „Marker“. Zu sehen ist ein deutlich Claudin-19-positiv gefärbtes Sammelrohr der äußeren Medulla. (a) zeigt das Claudin-19-Signal in rot, (b) zeigt das AE-1-Signal in grün, (c) die übereinander gelegten Bilder.

3.6.3 Claudin 8

Claudin 8 ließ sich ebenfalls in allen IMCD-Primärkulturen nachweisen (Abbildung 27). Es kam im grob geschätzten Intensitätsvergleich mit Claudin 19 jedoch in deutlich geringerer Menge in der interzellulären TJ vor.

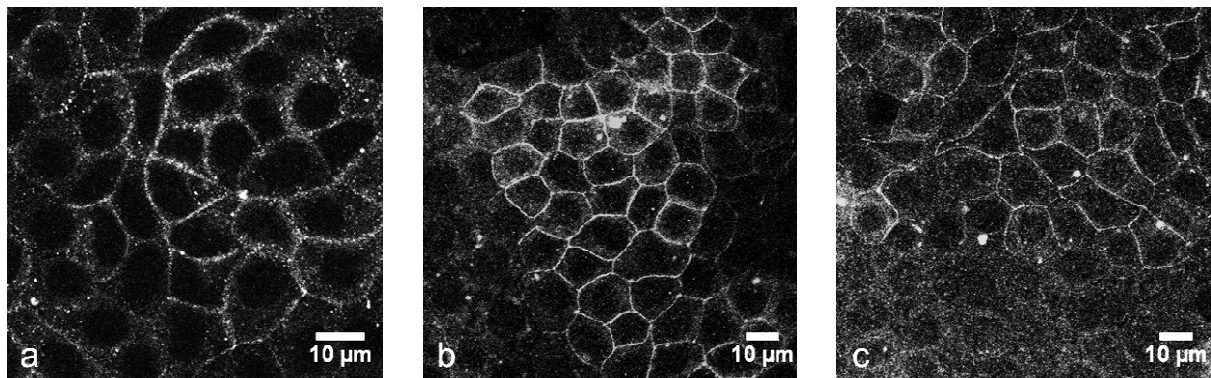


Abbildung 27: Claudin 8 Färbung bei 300-IMCD- (a), 600-IMCD- (b) und 900-IMCD-Zellen (c) in der Vergrößerung.

Zudem war die Verteilung weniger klar zu charakterisieren und wurde deshalb nicht so detailliert ausgewertet. Die Lokalisation von Claudin 8 in Bezug auf die TJ lässt sich für 300-IMCD-Zellen am ehesten als teils membranär, teils submembranär beschreiben, für 600-IMCD-Zellen als überwiegend

membranär und für 900-IMCD-Zellen teils membranär und teils vesikulär. Eine klare Kategorisierung und Statistik gelang jedoch nicht.

3.6.4 AQP2 und Claudin 10

Um die aus der inneren Medulla isolierten IMCD Zellen näher zu charakterisieren wurden sie auch auf die Expression des für Sammelrohrhauptzellen typischen Wasserkanals AQP2 hin untersucht.

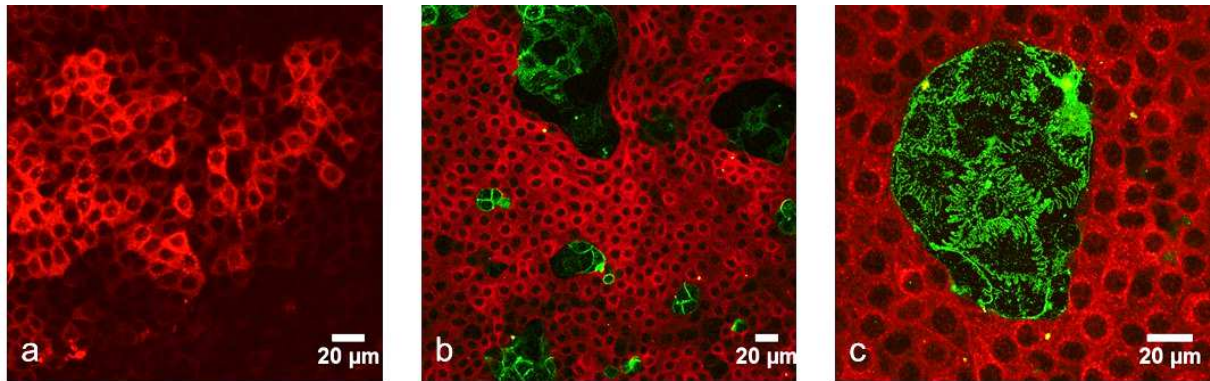
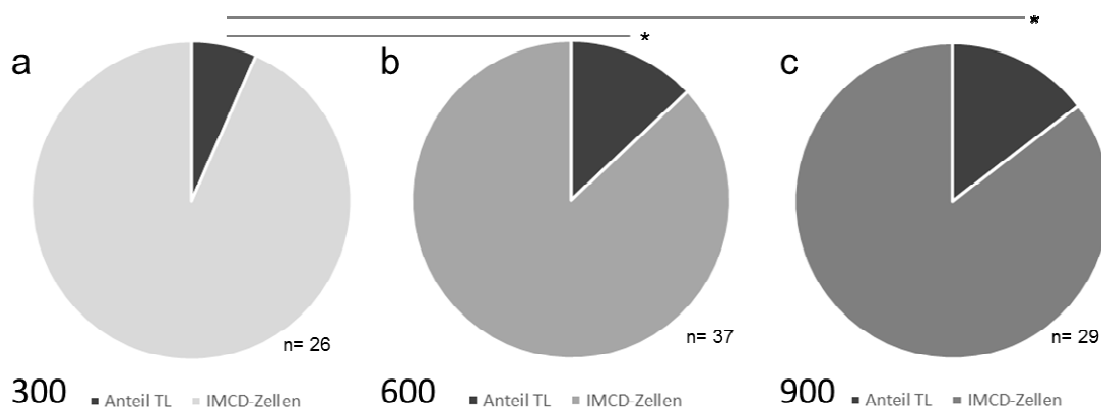


Abbildung 28: Färbung von AQP2 (rot) und Claudin 10 (grün) bei 300-IMCD- (a), 600-IMCD- (b) und 900-IMCD-Zellen (c). Dabei sind b und c fokussiert auf Bereiche mit Claudin-10-positiven Zellen.



	300	600	900
Anteil TL	6,63%	13,04%	14,68%
IMCD-Zellen	93,38%	86,96%	85,32%

Abbildung 29: Anteil der TL-Zellen an der IMCD-Primärkultur. Gezeigt sind jeweils die visuell geschätzten Anteile an Zellen der dünnen Henle-Schleife (TL) am Gesamtflächengehalt des Zellrasens der IMCD-Zellen auf Filtern, die bei 300 mosm/kg (a), 600 mosm/kg (b) und 900 mosm/kg (c) kultiviert worden sind.

AQP2 konnte nachgewiesen werden, zeigte jedoch eine erwartungsgemäß zytoplasmatische Lokalisation, da die Zellkulturen nicht mit ADH stimuliert wurden. Nachweislich handelt es sich also

bei den AQP2-positiven IMCD Zellen tatsächlich um Hauptzellen. Bei der AQP2-Färbung fielen jedoch Bereiche auf, die sich nicht anfärben ließen. Im Gegensatz zu IMCD-Hauptzellen waren diese Zellen gut mit Claudin 10-Antikörper zu färben und zeigten ein ganz unterschiedliches TJ-Muster.

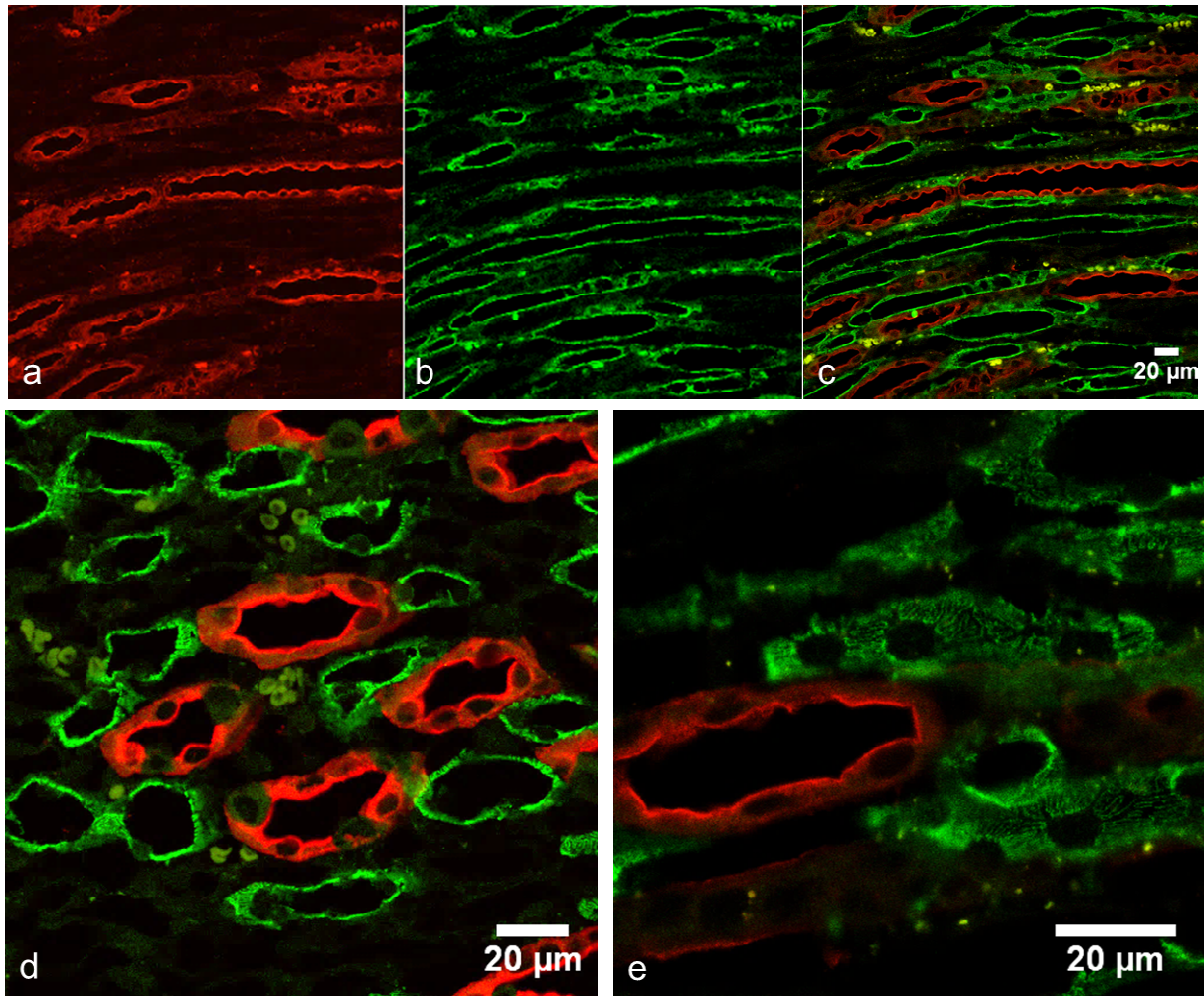


Abbildung 30: Färbung von AQP2 (rot) und Claudin 10 (grün) an 3 µm Nierenschnitten einer Rattenniere. Zu sehen ist ein Ausschnitt im Bereich der inneren Medulla, wo vom Tubulussystem nur Sammelrohre und Anteile der dünnen Henle-Schleife vorkommen. Nebeneinander von Sammelrohren, zu erkennen an der deutlich positiven Färbung für AQP2 (a, rot) und Teilen der dünnen Henle-Schleife, die deutlich positiv für Claudin 10 sind (b, grün). In c das übereinander gelegte Bild gezeigt. (d) und (e) zeigen Querschnitte in Vergrößerung. Besonders in diesen beiden Bildern lässt sich die auffällige TJ-Morphologie der Zellen der dünnen Henle-Schleife nachvollziehen.

Die in Abbildung 28 zu sehenden, parallel gefärbten Claudin 10 positiven Zellen (grün), konnten unter Abstimmung mit den parallel gefärbten Nierenschnitten (Abbildung 30) als Zellen aus der dünnen Henle Schleife identifiziert werden. Diese Zellen des inneren Nierenmarks kamen in jeder Primärkultur vor, zeigten allerdings eine unterschiedliche Häufigkeitsverteilung. Ihr Anteil lag bei bis zu 30 % der bewachsenen Fläche und nahm mit steigender Osmolalität des verwendeten

Kultumediums deutlich zu. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich bei 300-IMCD-Zellen gegenüber 600-IMCD-Zellen und 900-IMCD-Zellen, Abbildung 29. Auffällig an der Morphologie der Claudin 10-positiven Zellen waren die in Abbildung 28 (c) gut zu erkennenden „fingerförmigen“ Zellausläufer mit stark mäandrierenden TJs. Diese auffällige Morphologie lässt sich an den Nierenschnitten (Abbildung 30, e) ebenfalls nachvollziehen.

Für die ebenfalls Hauptzellen-spezifische β -Untereinheit des Natriumkanals ENaC gelang der Nachweis mittels Immunofluoreszenzfärbung nicht, auch nicht in den unter 300 mosm/kg kultivierten Zellen, in denen funktionell ENaC nachgewiesen werden konnte (Amilorid-hemmbarer I_{sc}). Die Membranproteine AE-1, Pendrin und H^+ -ATPase als Beispiele für Schaltzellen-spezifische Transportproteine konnten nicht nachgewiesen, so dass wir davon ausgehen, dass diese Zellpopulation in den IMCD-Kulturen nicht vertreten war.

Das zusätzlich getestete Claudin 15 konnte nicht in IMCD Zellkulturen nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1. Methodendiskussion

4.1.1 Aussagekraft der primären IMCD-Zellkultur

Die IMCD-Primärkultur ist eine seit über 30 Jahren etablierte Methode, um Sammelrohrzellen der Niere zu charakterisieren. Während sich Übersichtsarbeiten in den 1980er Jahren zunächst auf die methodische Isolierung von Sammelrohrhauptzellen fokussierten [14, 48], wurde anschließend auch eine umfassende Charakterisierung der so gewonnenen IMCD-Zellen auf Filtern veröffentlicht [26]. Es zeigten sich reproduzierbare und konsistente Eigenschaften der so gewonnenen Zellkulturen. Eine weitere Übersichtsarbeit konnte zeigen, dass IMCD-Zellen, die auf Filtern ausgesät wurden, eine polare Ausrichtung ähnlich der *in-vivo*-Bedingungen annehmen konnten [46]. Mit der Zeit wurde die Präparationsmethode etwas modifiziert. Grundsätzlich beruht die Präparationsmethode auf der Beobachtung, dass IMCD-Zellen resistenter gegenüber „hypotonem Schock“ [48] sind, als andere Zellen der Papille [14, 48]. Während in den früheren Arbeiten noch destilliertes Wasser als „hypotoner Schock“ zur Selektion der robusteren Sammelrohrzellen eingesetzt wurde, veränderte sich die Methode dahingehend, dass speziell auf diesen Schritt verzichtet wurde [42, 46]. Es ergaben sich trotzdem Zellkulturen, die zu >95 % aus reinen Sammelrohrzellen bestanden [26, 46, 48]. Die in dieser Arbeit benutzte Präparationsmethode entsprach der Vorgehensweise, wie sie Maric *et al.* beschreiben [42].

Die Werte für die mehrfach schon beschriebenen elektrophysiologischen Eigenschaften wie R_{te} , V_{te} und I_{sc} meiner IMCD-Primärkulturen waren mit denen der frühen Charakterisierungen dieser Zellen vergleichbar [26, 48]. Im Vergleich mit den Ergebnissen von Ruhfus *et al.*, die polare IMCD-Kulturen bei 600 mosm/kg kultivierten und beobachteten, wurde insbesondere bei den Zellen mit 600 mosm/kg Umgebungsosmolalität ein beständig niedrigerer R_{te} gemessen, wobei die Zellen mit 300 mosm/kg Umgebungsosmolalität ähnliche Werte für R_{te} aufwiesen [46].

4.1.2 Reinheit der IMCD-Kultur

Bezüglich der Reinheit der IMCD-Kulturen ergab sich für meine IMCD-Kulturen keine zu >95 % aus Sammelrohrzellen bestehende Zellpopulation, wie sie zuvor beschrieben wurde, [46, 48]. Insbesondere augenscheinlich wurde dies durch die Immunfluoreszenz-Färbung von AQP2 und Claudin 10 (Abbildung 28, Abschnitt 0). Hierbei fielen Zellen auf, die sich aufgrund ihrer Negativität für AQP2 nicht dem Sammelrohr zuordnen ließen. In Zusammenschau mit Immunfluoreszenzfärbungen von Nierenschnitten (Abbildung 30) handelte es sich um Zellen der dünnen Henle-Schleife, die in der Papille jeder Niere ebenfalls vorkommen. Sie waren in allen Kulturansätzen vorhanden. Ihr Anteil variierte und nahm mit steigender Osmolalität zu, der maximale Anteil lag im Schnitt bei 15 % Fläche des Zellrasens auf einem Filter (Abbildung 29). Hier besteht ein möglicher Zusammenhang zur

Modifikation der Präparationsmethode [42] wie sie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben ist, konkret zu dem Verzicht auf den „hypotonen Schock“ durch destilliertes Wasser, der ursprünglich zur Präparation routinemäßig appliziert wurde, um Zellen der dünnen Henle-Schleife heraus zu lysieren, [14, 26, 48]. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen sind somit unter dem Vorbehalt zu interpretieren, dass nach dem Mehrheitsprinzip also hauptsächlich die Sammelrohrzellen in den erhobenen Messwerten widerspiegeln sind, es aber unklar bleibt, welchen Anteil und Effekt die Zellen der dünnen Henle-Schleife an und auf ebendiese hatten.

4.1.3 Anwendungsseite der Osmolalität

Die Fähigkeit der IMCD-Zellen, sich auf Kollagen-beschichteten Filtern polar ähnlich wie *in-vivo* auszurichten ist bisher gut untersucht und bestätigt worden [46]. Die Variation der Osmolalität in der Umgebung wurde in meiner Arbeit stets von beiden Seiten, also luminal und basolateral angewendet. Dies simuliert eine *in-vivo* Situation, in der die Sammelrohrzellen keine Feinregulation der Harnzusammensetzung mehr vornehmen müssen und verkennt ihre Polarität, die es ermöglicht, mit Osmolalitätsunterschieden auf der luminalen und basolateralen Seite zurecht zu kommen. Eine diese Tatsache berücksichtigende Anwendung von unterschiedlichen Osmolalitäten luminal und basolateral kann sicherlich einen weiteren Erkenntnisgewinn liefern. Die in meiner Versuchsdurchführung auf beiden Seiten gleiche Umgebungsosmolalität unterscheidet sich also von der *in-vivo* Situation und fußt allein auf dem angenommenen Vorhandensein möglicher „Osmolalitäts-Sensoren“ in Sammelrohrzellen, die dann komplexe zellphysiologische regulatorische Vorgänge in Gang setzen, die schließlich in den erhobenen Messparametern abgreifbar sind. Ähnliches ist bereits für das *Tonicity-responsive enhancer binding protein* (TonEBP) beschrieben, das maßgeblich an der Resistenz von Sammelrohrzellen gegenüber hypertonem osmotischem Stress im umgebenden Milieu beteiligt ist [21].

4.2 Ergebnisdiskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass IMCD-Zellen auf unterschiedliche osmotische Umgebung mit ihren Transporteigenschaften reagieren und das sowohl für den transzellulären als auch für den parazellulären Transportweg. 300-IMCD-Zellen zeigten als einzige nennenswerten amilorid-hemmbareren elektrogenen Natriumtransport, dazu den höchsten R_{te} und eine deutliche Kationenselektivität des parazellulären Weges. 900-IMCD-Zellen hatten keinen elektrogenen Natriumtransport, einen sehr niedrigen R_{te} und zeigten eine Anionenselektivität der TJs. 600-IMCD-Zellen nahmen eine Mittelstellung ein, glichen aber insgesamt eher den 900-IMCD-Zellen. Bei dem Versuch ein Korrelat dieser Veränderung in der Claudin-Expression dieser Zellen zu finden, fiel besonders Claudin-19 auf, dessen Lokalisation sich von membranständig in der TJ in 300-IMCD-Zellen bis zu einer intrazellulären vesikulären Verteilung in 900-IMCD-Zellen erstreckte, d.h. je niedriger die Umgebungsosmolalität desto mehr Claudin-19 befand sich tatsächlich in den TJ.

Im Folgenden wird nun auf mögliche Sensormechanismen für die Osmolalität, auf die Regulation von Claudinen und auf Claudin-19 im Besonderen eingegangen. Des Weiteren soll die Veränderung im Kontext der Physiologie des Sammelrohrs kurz diskutiert werden.

4.2.1 Osmosensing

Wie bereits in der Einleitung angeführt (siehe 1.1.6, [32]), sind die Zellen des Nierenmarks je nach Funktionszustand der Niere deutlich ausgeprägten Schwankungen der Osmolalität ausgesetzt und müssen auch unter so hohen Osmolalitäten wie 1200 mosm/kg (oder sogar noch höher in der Nagerniere) ihrer physiologischen Funktion nachkommen. Osmotischer Stress führt zu erheblicher zellulärer Belastung von Gegenregulationsmechanismen und kann bis zur Apoptose und Zelltod führen [36]. Als Osmosensoren werden immer wieder mechanosensitive Ionenkanäle [33] diskutiert, da Änderungen der Osmolalität direkt auch das Zellvolumen und die mechanische Spannung der Doppellipidschicht der Membran beeinflussen. Auch Wasserkanäle selbst, die natürlich in Sammelrohrzellen eine besonders prominente Rolle spielen, werden als direkte Osmosensoren beschrieben, [22]. In IMCD Zellen kommt neben dem ADH-regulierten AQP2, das hier nicht in den luminalen Membranen vorhanden war, da keine Hormone zugesetzt wurden, auch AQP3 und AQP4 basolateral vor [32]. Welche Kanäle in den untersuchten IMCD Zellen letztendlich die Rolle des Osmosensors übernehmen, ist nicht geklärt, jedoch gibt es in der Literatur bereits Hinweise auf die weitere Signalverarbeitung und zellphysiologischen Regulationsmechanismen. Möglich ist eine, über den osmosensitiven Transkriptionsfaktor TonEBP [19, 28] vermittelte veränderte Expression verschiedener Proteine, die die erhobenen transportphysiologischen Messparameter dann indirekt beeinflussen. Für TonEBP konnten bereits mehrere Gene identifiziert werden, deren Hochregulation bzw. Herabregulation unmittelbar durch hypertonen Stress beeinflusst werden [47], darunter auch z.B. AQP2 [21]. Allerdings konnte speziell für ENaC eine hyperosmolalitätsinduzierte und gleichzeitig von TonEBP unabhängige verringerte Expression gezeigt werden [10]. Da auch die IMCD Zellen, die unter höherer Osmolalität kultiviert wurden, mit der ENaC Expression deutlich niedriger lagen, ist dieser Mechanismus für die gezeigten Ergebnisse eventuell ebenfalls in Betracht zu ziehen. Als Ursache wird hier die über hyperosmolaren Stress im endoplasmatischen Retikulum induzierte sogenannte *unfolded protein response* (UPR) diskutiert [10] und die darüber vermittelte Zellantwort z.B. in Form von Proteinmodifikation erklärt.

4.2.2 Regulation des parazellulären Weges

Der elektrische Widerstand eines Epithels setzt sich vereinfacht aus dem Widerstand der einzelnen Membranen (involviert im transzellulären Transport) und parallel dazu dem parazellulären Widerstand über die TJ zusammen [18]. Unter den beschriebenen Bedingungen und in Anwesenheit von Amilorid wird R_{te} dabei hauptsächlich vom parazellulären Weg bestimmt. Zusätzlich wurde hier die Dichtigkeit gegenüber Makromolekülen untersucht. Die IMCD-Zellen zeigten insgesamt eine geringe

Durchlässigkeit gegenüber dem Makromolekül 40 kD-FITC-Dextran, 900-IMCD-Zellen zeigten jedoch eine leichte, signifikant höhere Permeabilität, parallel zu dem niedrigsten R_{te} . Außerdem ergaben sich sehr ausgeprägte Unterschiede für die Ionenselektivität mit Kationenpräferenz in 300-IMCD-Zellen und Anionenpräferenz der TJ von 900-IMCD-Zellen. Die Claudine sind diejenigen TJ-Proteine, denen bei der Regulation und Determination der hier genannten Eigenschaften die größte Bedeutung zukommt [17]. In der vorliegenden Arbeit fiel vor allem die deutliche veränderte Claudin-19-Lokalisation auf. Claudin 19 ist in 300-IMCD-Zellen, die den höchsten R_{te} und eine Kationenselektivität aufweisen signifikant vermehrt membranär zu finden. Claudin-19 ist ein Barriere-Claudin, wobei es sowohl für Anionen als auch für Kationen Barrierefunktionen übernehmen kann [17]. In der TAL ist Claudin 19 gemeinsam mit Claudin 16 maßgeblich an der parazellulären Natrium-Selektivität beteiligt [24]. Der Barrierefunktion von Claudin 19 lassen sich also möglicherweise die hohen Werte für R_{te} sowie die niedrigen Werte für die absoluten Natrium- und Chlorid-Permeabilitäten zuschreiben. Mit reduzierter membranärer Claudin-19-Lokalisation sinkt im Umkehrschluss also auch der transepitheliale Widerstand. Tomas Berl beschrieb ebenfalls Effekte von erhöhter Osmolalität auf IMCD Zellen, wobei er jedoch an plasma-isotone Bedingungen angepasste Zellen in schnellem Wechsel hohen Osmolalitäten aussetzte und umgekehrt [5]. Dabei fand er heraus, dass Claudin-4 bei der Adaptation an höhere Osmolalitäten hochreguliert wird. Claudin-4 selber wurde von mir nicht untersucht, für Claudin-8, welches mit Claudin-4 eng assoziiert ist [25], konnte ich jedoch keine signifikanten Unterschiede feststellen, zumindestens nicht, was die subzelluläre Lokalisation betrifft. Tatsächlich ist die Regulation der TJ Permeabilität, Dichtigkeit und Selektivität zusätzlich auch durch posttranslationale Modifikationen möglich, wie bereits für Claudin-16 [27] und Claudin-4 [37] beschrieben. Daraufhin wurde jedoch weder Claudin-4 noch Claudin-8 untersucht, so dass eine quantitative Erhöhung dieser potentiell anionenselektiven Claudine oder eine posttranslationale Modifikation bei dem Shift der Selektivität von 300-IMCD-Zellen, über die 600-IMCD-Zellen zu den 900-IMCD-Zellen durchaus eine Rolle spielen könnten.

4.2.3 Physiologische Einordnung und These der Umprogrammierung

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchung im Hinblick auf den elektrogenen Natriumtransport zeigen in Abhängigkeit von der umgebenden Osmolalität eine Regulierung der Kerngrößen wie R_{te} , V_{te} und I'_{sc} . Dabei konnte in Zellen, die einer Umgebungsosmolalität von 300 mosm/kg ausgesetzt waren, ein hoher transepithelialer elektrischer Widerstand, ein lumen negatives transepitheliales Potential sowie ein durch Amilorid hemmbarer I'_{sc} nachgewiesen werden. Das impliziert das Vorhandensein des epithelialen Natriumkanals ENaC, der insbesondere cortical und in der äußeren Medulla für die Feinregulation der Harnzusammensetzung zuständig ist und im Sammelrohr der äußeren Medulla durch Hyperosmolalität herabreguliert wird [10]. Expressionsstärke der ENaC-Untereinheiten zeigen von kortikal nach medullär eine deutlich abnehmende Tendenz, [11]. Dies könnte bedeuten, dass die IMCD-Zellen, die einem potentiell hochosmolaren Milieu der inneren

Medulla entnommen wurden, die Möglichkeit besitzen, Eigenschaften von kortikalen bzw. Sammelrohrhauptzellen der äußeren Medulla, CCD- und OMCD-Zellen (*engl.* cortical collectind duct; outer medullary collecting duct) im Sinne einer „Umprogrammierung“ anzunehmen. Auslöser dieser „Umprogrammierung“ könnte die für Verhältnisse der inneren Medulla niedrigere Umgebungsosmolalität von 300 mosm/kg sein, die wiederum der im Cortex stets konstant gehaltenen interstitiellen Osmolalität entspricht. Im Umkehrschluss lässt sich anhand meiner Ergebnisse nachvollziehen, dass hyperosmolarer Stress zu einer Herabregulation von ENaC führt [10, 11]. Überträgt man dies auf ein *in vivo* Modell, so spiegeln die 300-IMCD-Zellen Eigenschaften des kortikalen und äußermedullären und die 900-IMCD-Zellen möglicherweise die des innermedullären Sammelrohrs wider. In Cortex und äußerer Medulla mit der Feinregulation der Harnzusammensetzung durch ENaC und hoher Dichtigkeit, respektive hohem R_e , zur Verhinderung von parazellulären Lecks und strengerer transzellulärer Regulation des Stofftransports und in der inneren Medulla ohne aktiven transzellulären Stofftransport. Unter Annahme dieser Hypothese wäre in den 300-IMCD-Zellen eine parazelluläre Anionenselektivität zu erwarten, da das generierte transepitheliale Potential Chloridionen aus dem Lumen parazellulär nach basolateral treiben würde. Konträr hierzu konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings eine leichte Kationenselektivität nachgewiesen werden.

Es ergaben sich keine Hinweise auf das Vorhandensein von ENaC in 600- und 900-IMCD-Zellen, was kongruent zu den Ergebnissen von Crambert *et al.* zu sehen ist [10], die eine TonEBP-unabhängige Herabregulation von ENaC beschreiben. Auch Cai *et al.* konnten in einem *in vivo*-Modell zeigen, dass einige Untereinheiten des ENaC im IMCD durch Wasserrestriktion und konsekutiver hoher Umgebungsosmolalität herunter reguliert werden [8]. Durch luminale Amiloridapplikation zeigte sich sogar ein stärker negativer $\Delta I'_{SC}$ bei 900-IMCD-Zellen. Dieses Phänomen konnte im Rahmen der Arbeit nicht ursächlich geklärt werden.

4.2.4 Bedeutung der dünnen Schleifen für die Ergebnisse

4.2.4.1 Dünne Schleifen als Leck

Es ist anzunehmen, dass die TL-Zellen (Abbildung 28, Abbildung 29) auf die Messergebnisse einen Einfluss hatten. Dabei kann man zunächst unter Berücksichtigung von Untersuchungen an isoliert perfundierten TLs in unserer Arbeitsgruppe von funktionell lecken Flächen im IMCD-Zellrasen ausgehen. Unter Kontrollbedingungen zeigten die TLs einen mittleren Widerstand R_e von $15 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und keine Kationen- bzw. Anionen-Präferenz ($P_{Na}/P_{Cl} = 1$). Damit sind die Aussagen zu meinen erhobenen Messparametern weiterhin richtig, werden aber wahrscheinlich in ihrer Größe eher unterschätzt.

Zur genaueren Überprüfung, kann man anhand der Flächenauswertung (Abbildung 29) z.B. berechnen, welchen Anteil am Gesamtwiderstand die TLs gehabt haben können. Dabei ergibt sich in

300-IMCD-Zellen mit einem maximal hohen IMCD-Widerstand ($42 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) in Parallelschaltung ein TL-Widerstand von $35 \Omega \cdot \text{cm}^2$, der in der Summe den gemessenen Durchschnittswiderstand von $575 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ergibt. Gehen wir auch für 600-IMCD- und 900-IMCD-Zellen mindestens von diesem TL-Widerstand aus, so errechnen sich Widerstände für die IMCD-Zellen von $174 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (600-IMCD) und $50 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (900-IMCD). Der Flächenwiderstand von IMCD-Zellen nimmt also auch mit Einfluss von TL-Zellen mit steigender Osmolalität der Umgebung ab.

Nähern wir uns bei diesen Ausführungen den in der Literatur für IMCD-Zellen bisher beschriebenen Widerständen [46] um $1100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ an, so können für die TLs in 300-IMCD-Zellen auch rein rechnerisch höhere Werte um $70 \Omega \cdot \text{cm}^2$ angenommen werden. Dies wiederum könnte ein Hinweis auf die Osmoregulation auch dieser Zellen der inneren Medulla sein.

4.2.4.2 Dünne Schleifen als Claudin10b-abhängige kationenselektive Zellen

Auch die Ergebnisse für die parazelluläre Selektivität der IMCD-Zellen können durch die TLs beeinflusst sein. Die erhobenen Messparameter lassen eine leichte Kationenselektivität bei 300-IMCD-Zellen und eine Anionenselektivität bei 900-IMCD-Zellen vermuten. Die 600-IMCD-Zellen nahmen eine Mittelstellung ein. Auch diese Selektivitäten sind dann als Summe aus den möglicherweise konträren Selektivitäten von IMCD- und TL-Zellen zu bewerten.

Nehmen wir für die TLs eine Claudin10b-Ausstattung und damit eine Kationenselektivität und für die IMCD-Zellen eine Anionenselektivität an, dann kann man wiederum unter Berücksichtigung der Flächenverteilung (Abbildung 29) errechnen, dass die erhobenen Messwerte nur zu erreichen bzw. zu messen sind, wenn die Anionenselektivität von 300-IMCD-Zellen höher ist als die von 900-IMCD-Zellen, die Anionenselektivität also bei gleichbleibend starker Kationenselektivität der TLs mit steigender Osmolalität abnimmt. Übertragen auf den kortikomedullären osmotischen Gradienten (Abbildung 7) ist diese Hypothese zumindest kongruent zum ENaC-getriebenen kortikalen parazellulären Chloridtransport. Wie zuvor bereits ausgeführt ist in der inneren Medulla kaum ENaC exprimiert [10], sodass eine reduzierte Anionenselektivität in diesem hyperosmolarem Milieu ebenfalls plausibel erscheint.

5 Zusammenfassung

Die Niere als wesentliches Organ des Wasser- und Elektrolythaushaltes erfüllt eine Reihe wichtiger Funktionen. Insbesondere die enorme Filtrationsleistung und Produktion von 180 l Primärharn pro Tag, von dem letztlich durch hocheffiziente und regulierte Transportvorgänge entlang des Nephrons nur ein Bruchteil ausgeschieden wird, seien an dieser Stelle nochmals erwähnt. Hierfür sind die individuellen Eigenschaften eines jeden Nephronabschnitts entscheidend. Diese Eigenschaften wiederum sind ein Produkt aus jeweiliger luminaler sowie basolateraler Zellausstattung und der Zusammensetzung der interzellulären Tight Junctions (TJs). Oder anders formuliert ein Produkt aus transzellulären und parazellulären Transportvorgängen.

So gelingt unter anderem im Zusammenspiel zwischen Nierentubuli und Gefäßen auf Grundlage des Gegenstromprinzips die Generierung eines kortikomedullären osmotischen Gradienten. Dieser wiederum ermöglicht es der Niere, einen hypotonen Harn bei Wasserdiurese mit minimal 50 mosm/kg zu produzieren, bei antidiuretischen Bedingungen einen von maximal 1200 mosm/kg. Das bedeutet insbesondere für die Zellen des inneren Nierenmarks eine große Herausforderung. Sie sind wie kaum andere Zellen des Organismus ständig wechselnden Umgebungsosmolalitäten ausgesetzt. Dies führte zu der Hypothese der Osmoregulation von funktionellen und morphologischen Eigenschaften dieser Zellen.

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich untersucht, welchen Einfluss Umgebungsosmolalität auf transportphysiologische Vorgänge ebendieser innermedullären Sammelrohrzellen haben kann. Hierzu wurde das etablierte Zellmodell der IMCD-Primärkultur gewählt. IMCD-Zellen wachsen als polarisiertes Epithel auf Filtern, vergleichbar zur *in vivo* Situation. Es wurden drei Gruppen von IMCD-Zellen miteinander verglichen, die gewählten Umgebungsosmolalitäten wurden auf 300, 600 und 900 mosm/kg festgesetzt. Als Ergebnis der elektrophysiologischen Messungen konnte gezeigt werden, dass sich zwischen den 3 Gruppen signifikante Unterschiede bei der Erhebung des transepithelialen Widerstands, des transepithelialen Potentials und des äquivalenten Kurzschlussstroms ergaben. Auch die parazellulären Permeabilitäten für Natrium und Chlorid differierten signifikant voneinander. Bei 300 mosm/kg kultivierte Zellen hatten Eigenschaften eines transzellulär transportierenden Epithels mit Generierung eines lumennegativen transepithelialen Potentials und eines hohen transepithelialen Widerstandes, was das Vorhandensein von ENaC bzw. eines transzellulären Natriumtransports wahrscheinlich macht. Sie ähnelten in ihren Eigenschaften Zellen aus dem kortikalen Bereich des Sammelrohrs. Eine parazelluläre Chlorid-Präferenz bzw. Anionen-Selektivität wie es für diese Zellen zu erwarten wäre, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht nachweisen. Bei 900 mosm/kg kultivierte Zellen generierten kein transepitheliales Potential, einen niedrigen transepithelialen Widerstand und höhere parazelluläre Durchlässigkeiten sowohl für Ionen

als auch für Makromoleküle wie Dextran. Bei 600 mosm/kg kultivierte Zellen nahmen bezüglich der beschriebenen Eigenschaften eine Mittelstellung ein.

Eine Charakterisierung parazellulärer Transportvorgänge sollte verknüpft sein mit der Betrachtung der Zusammensetzung der TJ, über die parazellulärer Transport stattfinden und auch unterbunden werden kann. Hierbei lag der Fokus auf den Claudinen als wesentlicher Bestandteil für Größen- und Ladungsselektivität der TJ. Deshalb wurden die Experimente ergänzt um Immunfluoreszenzfärbungen von Claudinen. Tatsächlich ergaben sich hier Unterschiede für Claudin-19, dessen membranärer Einbau in die TJ von Zellen kultiviert unter 300 mosm/kg abnahm bis zu einer deutlich vesikulären Verteilung in Zellen kultiviert unter 900 mosm/kg. Claudin-19 spielt, als vornehmlich abdichtendes Claudin, hierbei wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Widerstandserhöhung unter 300 mosm/kg.

Die vorliegende Arbeit gibt also erste Hinweise auf eine Osmoregulation von Proteinexpression und Transportfunktion in Zellen der inneren Nierenmedulla und nutzt dazu effektiv das Modell der IMCD-Filter-Kulturen. Die in allen IMCD-Kulturen vorhandenen Zellen der dünnen Henle-Schleife, die ebenso wie IMCD-Zellen in hochosmolarer Umgebung der inneren Medulla existieren, führten in der Summe am ehesten zu einer Unterschätzung der erhobenen Parameter. Es ergaben sich außerdem Hinweise auf eine Osmoregulation auch dieser Zellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abuazza, G., et al., Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. 291(6): p. F1132-41.
2. Angelow, S., et al., Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. 293(1): p. F166-77.
3. Barry, P.H. and J.W. Lynch, Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol*, 1991. 121(2): p. 101-17.
4. Ben-Yosef, T., et al., Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet*, 2003. 12(16): p. 2049-61.
5. Berl, T., How do kidney cells adapt to survive in hypertonic inner medulla? *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2009. 120: p. 389-401.
6. Breiderhoff, T., et al., 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*, 2012. 109(35): p. 14241-6.
7. Brown, D. and J.L. Stow, Protein trafficking and polarity in kidney epithelium: from cell biology to physiology. *Physiol Rev*, 1996. 76(1): p. 245-97.
8. Cai, Q., et al., Vasopressin increases expression of UT-A1, UT-A3, and ER chaperone GRP78 in the renal medulla of mice with a urinary concentrating defect. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010. 299(4): p. F712-9.
9. Claude, P., Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol*, 1978. 39(2-3): p. 219-32.
10. Crambert, G., et al., Epithelial sodium channel abundance is decreased by an unfolded protein response induced by hyperosmolality. *Physiol Rep*, 2014. 2(11).
11. Duc, C., et al., Cell-specific expression of epithelial sodium channel alpha, beta, and gamma subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Cell Biol*, 1994. 127(6 Pt 2): p. 1907-21.
12. Enck, A.H., U.V. Berger, and A.S. Yu, Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. 281(5): p. F966-74.

13. Gong, Y., et al., Claudin-14 regulates renal Ca²⁺ transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway. *EMBO J*, 2012. 31(8): p. 1999-2012.
14. Grenier, F.C., Characteristics of renal collecting tubule cells in primary culture. *Miner Electrolyte Metab*, 1986. 12(1): p. 58-63.
15. Gunzel, D., Claudins: vital partners in transcellular and paracellular transport coupling. *Pflugers Arch*, 2017. 469(1): p. 35-44.
16. Gunzel, D., et al., Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 10): p. 1507-17.
17. Gunzel, D. and A.S. Yu, Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*, 2013. 93(2): p. 525-69.
18. Gunzel, D., et al., From TER to trans- and paracellular resistance: lessons from impedance spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. 1257: p. 142-51.
19. Halterman, J.A., H.M. Kwon, and B.R. Wamhoff, Tonicity-independent regulation of the osmosensitive transcription factor TonEBP (NFAT5). *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012. 302(1): p. C1-8.
20. Hamann, C.H. and W. Vielstich, *Elektrochemie*. 4., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage ed. 2005, Weinheim: Wiley-VCH-Verlag GmbH & Co. KGaA. XVIII, 662 Seiten.
21. Hasler, U., et al., Tonicity-responsive enhancer binding protein is an essential regulator of aquaporin-2 expression in renal collecting duct principal cells. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(6): p. 1521-31.
22. Hill, A.E. and Y. Shachar-Hill, Are Aquaporins the Missing Transmembrane Osmosensors? *J Membr Biol*, 2015. 248(4): p. 753-65.
23. Hou, J., et al., Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(36): p. 15350-5.
24. Hou, J., et al., Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest*, 2008. 118(2): p. 619-28.
25. Hou, J., et al., Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(42): p. 18010-5.

26. Husted, R.F., M. Hayashi, and J.B. Stokes, Characteristics of papillary collecting duct cells in primary culture. *Am J Physiol*, 1988. 255(6 Pt 2): p. F1160-9.
27. Ikari, A., et al., Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 9): p. 1781-9.
28. Jeon, U.S., et al., How tonicity regulates genes: story of TonEBP transcriptional activator. *Acta Physiol (Oxf)*, 2006. 187(1-2): p. 241-7.
29. Kahle, K.T., et al., Paracellular Cl⁻ permeability is regulated by WNK4 kinase: insight into normal physiology and hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(41): p. 14877-82.
30. Kimizuka, H. and K. Koketsu, Ion transport through cell membrane. *J Theor Biol*, 1964. 6(2): p. 290-305.
31. Kiuchi-Saishin, Y., et al., Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol*, 2002. 13(4): p. 875-86.
32. Klinke, R., et al., *Physiologie*. 6., vollst. überarb. Aufl. ed. 2010, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XII, 944 S.
33. Kocer, A., Mechanisms of mechanosensing - mechanosensitive channels, function and re-engineering. *Curr Opin Chem Biol*, 2015. 29: p. 120-7.
34. Konrad, M., et al., Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet*, 2006. 79(5): p. 949-57.
35. Krug, S.M., et al., Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell Mol Life Sci*, 2012. 69(16): p. 2765-78.
36. Lang, F., Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr*, 2007. 26(5 Suppl): p. 613S-623S.
37. Le Moellic, C., et al., Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. 289(6): p. C1513-21.
38. Lee, N.P., et al., Kidney claudin-19: localization in distal tubules and collecting ducts and dysregulation in polycystic renal disease. *FEBS Lett*, 2006. 580(3): p. 923-31.
39. Li, H., D.N. Sheppard, and M.J. Hug, Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cyst Fibros*, 2004. 3 Suppl 2: p. 123-6.

40. Li, W.Y., C.L. Huey, and A.S. Yu, Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. 286(6): p. F1063-71.
41. Lüllmann-Rauch, R., Taschenlehrbuch Histologie. 2., komplett überarb. Aufl. ed. 2006, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XVII, 637 S.
42. Maric, K., A. Oksche, and W. Rosenthal, Aquaporin-2 expression in primary cultured rat inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol*, 1998. 275(5 Pt 2): p. F796-801.
43. Milatz, S. and T. Breiderhoff, One gene, two paracellular ion channels-claudin-10 in the kidney. *Pflugers Arch*, 2017. 469(1): p. 115-121.
44. Morris, R.C., Jr., et al., Relationship and interaction between sodium and potassium. *J Am Coll Nutr*, 2006. 25(3 Suppl): p. 262S-270S.
45. Ng, B. and P.H. Barry, The measurement of ionic conductivities and mobilities of certain less common organic ions needed for junction potential corrections in electrophysiology. *J Neurosci Methods*, 1995. 56(1): p. 37-41.
46. Ruhfus, B., H.G. Bauernschmitt, and R.K. Kinne, Properties of a polarized primary culture from rat renal inner medullary collecting duct (IMCD) cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998. 34(3): p. 227-31.
47. Schulze Blasum, B., et al., The kidney-specific expression of genes can be modulated by the extracellular osmolality. *FASEB J*, 2016. 30(10): p. 3588-3597.
48. Stokes, J.B., C. Grupp, and R.K. Kinne, Purification of rat papillary collecting duct cells: functional and metabolic assessment. *Am J Physiol*, 1987. 253(2 Pt 2): p. F251-62.
49. Suzuki, H., et al., Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science*, 2014. 344(6181): p. 304-7.
50. Then, C., et al., Hypertonic stress promotes the upregulation and phosphorylation of zonula occludens 1. *Nephron Physiol*, 2011. 119(2): p. p11-21.
51. Van Itallie, C., C. Rahner, and J.M. Anderson, Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*, 2001. 107(10): p. 1319-27.
52. Van Itallie, C.M., et al., Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. 291(6): p. F1288-99.

53. Will, C., M. Fromm, and D. Muller, Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport. *Perit Dial Int*, 2008. 28(6): p. 577-84.
54. Yu, A.S., Claudins and the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 2015. 26(1): p. 11-9.
55. Yu, A.S., et al., Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem*, 2003. 278(19): p. 17350-9.

7 Anhang

7.2 Tierversuchsantrag

Die Tötung von Tieren zur Organentnahme wurde 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 herzlicher Dank gilt an erster Stelle meiner Betreuerin Dr. med. Nina Himmerkus und meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Markus Bleich. Ich danke für ein interessantes Thema, die stets geduldigen und fachlich exzellenten Ratschläge, wertvolle Notizzettel mit Zeichnungen und mentale und persönliche Begleitung durch die lange Zeit des Promotionsverfahrens, von der reinen Datenproduktion zum fertigen Schriftstück. Ebenso danke ich meinen Mit-Doktoranden, allen Master- und PhD-Studenten, den anderen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern der AG Nierenphysiologie des Physiologischen Instituts der CAU Kiel für die stetige große Hilfsbereitschaft untereinander und für anregende Küchendiskussionen, insbesondere Wiebke Basse, Allein Plain, Vera Wulfmeyer, Sandra Grüssel, Carolin Sandmann und Denise Rühmann.

Ich bedanke mich ganz besonders auch bei meinem Mann Johannes für die emotionale Unterstützung, das Verständnis und die Nachsicht beim langwierigen und anstrengenden Schreibprozess dieser für meine berufliche und persönliche Weiterentwicklung so wichtigen Arbeit.