

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

**OSMOREGULATION DER TIGHT JUNCTIONS
IN ZELLEN UND NEPHRONABSCHNITTEN DES
INNEREN NIERENMARKS**

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

vorgelegt von
SVENJA REBECCA SONNTAG
aus Eckernförde

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Bleich, Physiologisches Institut
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Kunzendorf, Klinik für Innere Medizin IV mit den
Schwerpunkten Nieren- und Hochdruckkrankheiten

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 30.01.2019

gez.: Prof. Dr. Christof Dörfer
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Niere.....	1
1.1.1 Histologischer Aufbau.....	1
1.1.2 Epithelialer Transport der Tubulussegmente.....	2
1.1.2.1 Proximaler Tubulus.....	4
1.1.2.2 Dünne Schleifen.....	4
1.1.2.3 Dicke aufsteigende Schleife.....	6
1.1.2.4 Distales Konvolut.....	6
1.1.2.5 Sammelrohr.....	6
1.1.3 Claudine und Tight Junctions.....	7
1.1.3.1 Claudin 2.....	9
1.1.3.2 Claudin 3.....	9
1.1.3.3 Claudin 4.....	9
1.1.3.4 Claudin 7.....	10
1.1.3.5 Claudin 8.....	10
1.1.3.6 Claudin 10.....	10
1.1.3.7 Claudin 16.....	10
1.1.3.8 Claudin 19.....	11
1.1.4 Konzentrierungsmechanismen.....	11
1.1.4.1 Harnkonzentrierung und das Gegenstromprinzip.....	11
1.1.4.2 Hormonelle Regulation.....	15

1.1.4.3 Zelluläre Osmoregulation.....	16
1.1.4.4. Cyclosporin A	17
1.2 Zellkulturmodell	17
1.3 Zielsetzung der Doktorarbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Chemikalien.....	19
2.2 Lösungen	19
2.3 IMCD-Primärzellkultur	21
2.3.1 Versuchstiere	21
2.3.2 Präparation des inneren Nierenmarks	21
2.3.3 Aufreinigung der Primärzellen.....	22
2.3.4 Beschichtung der Filter	23
2.3.5 Zellkulturmedium	23
2.3.6 Aussaat	23
2.3.7 Kultivierung.....	24
2.3.8 Transepitheliale Widerstandsmessung	24
2.3.9 Applikation von Hormonen.....	25
2.3.10 Applikation von Cyclosporin A.....	26
2.4 Ussing-Kammer-Messungen	26
2.4.1 Aufbau der Kammer	26
2.4.2 Versuchsdurchführung	27
2.4.3 Auswertung.....	29
2.4.4 Fixierung	33
2.5 Protokoll zur in vivo-Modulation des Wasserhaushalts	33
2.5.1 Versuchstiere	33
2.5.2 Metabolische Daten	35
2.5.2.1 Ein- und Ausfuhr.....	35

2.5.2.2 Urinosmolalität.....	35
2.5.2.3 Kottrockengewicht	35
2.5.3 Nierenpräparation	36
2.5.3.1 Durchführung	36
2.5.4 Tubulusdissektion	38
2.5.4.1 Durchführung	38
2.5.4.2 Dissektionskriterien.....	38
2.5.4.2.1 Sammelrohre.....	38
2.5.4.2.2 Dünne Schleifen	39
2.5.5 Tubulusperfusion	40
2.5.5.1 Aufbau.....	40
2.5.5.2 Versuchsdurchführung	42
2.5.5.3 Analyse.....	43
2.5.5.4 Fixierung	45
2.5.5.5 Herstellung der Kryoschnitte	46
2.6 Immunfluoreszenz	47
2.6.1 Extern vorbehandelte Versuchstiere.....	47
2.6.2 Färbung.....	47
2.6.2.1 IMCD-Kultur.....	49
2.6.2.2 Färbung von Kryoschnitten.....	50
2.6.3 Auswertung.....	51
2.6.3.1 IMCD-Kultur.....	52
2.6.3.1.1 Konfluenzanalyse	52
2.6.3.1.2 Auswertungskriterien.....	55
2.6.3.2 Extern vorbehandelte Versuchstiere.....	56
2.6.3.3 Tierversuch.....	57
2.7 Statistik	57

3 Ergebnisse	59
3.1 IMCD Zellen als in vitro-Modell des inneren Nierenmarks.....	59
3.1.1 Auswirkung plasmahypertoner Osmolalität auf IMCD-Kulturen	59
3.1.1.1 Unterschiede während der Kultivierung	59
3.1.1.2 Elektrophysiologische Unterschiede	59
3.1.1.3 Immunfluoreszenzauswertung nach unterschiedlicher Kultivierung	62
3.1.2 Auswirkung von Aldosteron bei 300 mOsm/kg	65
3.1.2.1 Auswirkung von Aldosteron auf die elektrophysiologischen Parameter	65
3.1.2.2 Einfluss von Aldosteron auf das Claudinexpressionsmuster	65
3.1.3 Auswirkung von AVP auf IMCD-Kulturen	66
3.1.3.1 Immunfluoreszenznachweis von AQP2	66
3.1.3.2 Auswirkung bei 300 mOsm/kg	67
3.1.3.2.1 Auswirkung von AVP auf die elektrophysiologischen Eigenschaften.....	67
3.1.3.2.2 Unterschiede in der Immunfluoreszenz	70
3.1.3.3 Auswirkung bei 600 mOsm/kg	71
3.1.3.3.1 Beeinflussung der Elektrophysiologischen Parameter durch AVP	71
3.1.3.3.2 Unterschiede in der Immunfluoreszenz	72
3.1.4 Auswirkung von Cyclosporin A	73
3.1.4.1 Einfluss von Cyclosporin A auf die elektrophysiologischen Parameter	73
3.1.4.2 Unterschiede in der Immunfluoreszenz.....	75
3.2 Auswirkung unterschiedlicher medullärer Osmolalitäten in vivo auf die Tubulusfunktion.....	77
3.2.1 Metabolische Parameter bei unterschiedlicher Diurese	77
3.2.2 Parazelluläre Transporteigenschaften bei unterschiedlicher Diurese	78
3.2.2.1 Dünne Schleifen	78
3.2.2.1.1 Absteigende dünne Schleifen	78
3.2.2.1.2 Aufsteigende dünne Schleifen	80

3.2.3 Claudinexpressionsanalyse in den Nieren	82
3.2.3.1 Claudin 2-Expressionsmuster unter Versuch 1	82
3.2.3.2 Claudin 4-Expressionsmuster.....	83
3.2.3.2.1 unter Versuch 1	84
3.2.3.2.2 unter Versuch 2.....	85
3.2.3.3 Claudin 7-Expressionsmuster.....	86
3.2.3.3.1 unter Versuch 1	86
3.2.3.3.2 unter Versuch 2.....	88
3.2.3.4 Claudin 10-Expressionsmuster.....	89
3.2.3.4.1 unter Versuch 1	89
3.2.3.4.2 unter Versuch 2.....	89
3.2.3.5 Claudin 16-Expressionsmuster.....	90
3.2.3.5.1 unter Versuch 1	90
3.2.3.5.2 unter Versuch 2.....	91
3.2.3.6 Claudin 19-Expressionsmuster.....	92
3.2.3.6.1 unter Versuch 1	92
3.2.3.6.2 unter Versuch 2.....	93
3.2.3.7 Weitere Claudine.....	94
4 Diskussion	95
4.1 Methodendiskussion	95
4.1.1 In vitro-Ansatz.....	95
4.1.1.1 Gewinnung und Kultivierung der Primärzellen	95
4.1.1.3 Expressionsanalyse.....	95
4.1.2 Ex vivo Ansatz	96
4.1.2.1 Der metabolische Käfig.....	96
4.1.2.2 Präparation und Tubulusperfusion	96
4.2 Eigenschaften der IMCD-Primärzellkultur unter Einfluss verschiedener Osmolalitäten	

und Hormone	97
4.2.1 Plasma-isotone Bedingungen als Signal der Umdifferenzierung	98
4.2.2 Die Wirkung von AVP auf die beiden Funktionszustände der IMCD-Kultur.....	99
4.2.3 CsA und Osmoregulation.....	100
4.2.4 IMCD-Kulturen als Mischkultur.....	101
4.3.1 IMdTL sind primär unselektiv und exprimieren Claudin 2, 4, 7 und 19.....	103
4.3.2 Aufsteigende dünne Schleifen werden bei Wasserdiurese parazellulär kationenselektiver	104
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick	106
5 Zusammenfassung	107
6 Literaturverzeichnis.....	109
7 Anhang	120
7.1 Tierversuchsantrag.....	120
8 Danksagung.....	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung eines Nephrons	2
Abbildung 2: Darstellung der epithelialen Transportmechanismen und deren elektrophysiologische Messung	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung von Transportmechanismen in der dTL	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung von Transportmechanismen in aTL.....	5
Abbildung 5: Schematische Darstellung von Transportmechanismen im Sammelrohr	7
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Claudins.....	8
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Harnkonzentrierung.....	13
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Tubulianordnung in der inneren Medulla.....	15
Abbildung 9: Widerstandsmessungen der 300 mOsm/kg-Kulturen	25
Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Ussing-Kammer.....	27
Abbildung 11: Auswertung der Ussing-Kammer-Aufzeichnung.....	29
Abbildung 12: Metabolische Käfige	34
Abbildung 13: Perfundiertes Sammelrohr.....	39
Abbildung 14: Dünne Schleifen	40
Abbildung 15: Aufbau des Perfusionssystems.....	42
Abbildung 16: Auswertung der Tubulusperfusion.....	45
Abbildung 17: LSM-Schema	52
Abbildung 18: Konfluenzanalyse.....	54
Abbildung 19: Expressionsmuster	55
Abbildung 20: Claudin 19 gefärbter Nierenschnitt	57
Abbildung 21: Widerstandsmessung bei unterschiedlichen Kulturbedingungen	59
Abbildung 22: Originalaufzeichnungen von DP's unterschiedlicher Osmolalitätsbedingungen	61
Abbildung 23: Vergleich elektrophysiologischer Parameter unter verschiedenen Osmolalitätszuständen.....	62
Abbildung 24: Immunfluoreszenzbilder nach unterschiedlicher Osmolalitätsbehandlung	63
Abbildung 25: Expressionsmuster der Claudine bei unterschiedlichen Kulturbedingungen... ..	64
Abbildung 26: Anteil dünner Schleifen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen	64
Abbildung 27: Elektrophysiologische Parameter mit und ohne Aldosteron-Applikation	65
Abbildung 28: Einfluss von Aldosteron auf das Claudinexpressionsmuster	66

Abbildung 29: Nachweis der AVP-Wirkung	66
Abbildung 30: Originalaufzeichnungen zur Wirkung von AVP auf das DP	67
Abbildung 31: Einfluss von AVP auf die elektrophysiologischen Parameter	68
Abbildung 32: Originalaufzeichnungen des DP's unter AVP-Einfluss	69
Abbildung 33: Einfluss von AVP auf die elektrophysiologischen Parameter	70
Abbildung 34: Claudinexpressionsmuster	70
Abbildung 35: Originalaufzeichnung des AVP-Einflusses.....	71
Abbildung 36: Einfluss von AVP auf die elektrophysiologischen Parameter	72
Abbildung 37: Einfluss von AVP auf das Claudinexpressionsmuster.....	73
Abbildung 38: Einfluss von AVP auf die Anwesenheit von Zellen dünner Schleifen in der Kultur	73
Abbildung 39: Einfluss von CsA auf das DP	74
Abbildung 40: Einfluss von CsA auf die elektrophysiologischen Parameter	75
Abbildung 41: CsA-Einfluss auf das Claudinexpressionsmuster	76
Abbildung 42: Einfluss von CsA auf das Claudinexpressionsmuster.....	76
Abbildung 43: Anteil von Zellen dünner Schleifen unter CsA-Einfluss	77
Abbildung 44: Metabolische Daten bei unterschiedlichen Diuresezuständen	78
Abbildung 45: Elektrophysiologische Untersuchung der dTL	79
Abbildung 46: Diffusionspotentiale der dTL in Abhängigkeit der Urinosmolalität	80
Abbildung 47: Originalaufzeichnung des DP der aTL.....	80
Abbildung 48: Elektrophysiologische Untersuchung der aTL.....	81
Abbildung 49: DP's in Abhängigkeit der Urinosmolalität	82
Abbildung 50: Claudin 2-Expression in der inneren Medulla	83
Abbildung 51: Claudin 2- AQP 1-Kofärbung einer Ratte unter Kontrollbedingungen	83
Abbildung 52: Übergang IMaTL in TAL und IMdTL im ISOM	84
Abbildung 53: Claudin 4-Expression in der inneren Medulla	85
Abbildung 54: Claudin 4-Expression im IM vorbehandelter Tiere	86
Abbildung 55: Claudin 7-Expression in der inneren Medulla	87
Abbildung 56: Claudin 7- AQP 1-Kofärbung in der inneren Medulla	87
Abbildung 57: Claudin 7-Expression im ISOM.....	88
Abbildung 58: Claudin 7-Expression im IM vorbehandelter Tiere	88
Abbildung 59: Claudin 10-Expression in der inneren Medulla	89
Abbildung 60: Claudin 10- und Claudin 16-Expression im IM vorbehandelter Tiere	90
Abbildung 61: Claudin 10-Expressionsmuster in IMaTL.....	90

Abbildung 62: Claudin 16-Expression in der inneren Medulla	91
Abbildung 63: Claudin 10- und Claudin 16-Expression in einer IMaTL	92
Abbildung 64: Claudin 19-Expression in der inneren Medulla	93
Abbildung 65: Claudin 19-Expression im IM vorbehandelter Tiere	94
Abbildung 66: IMaTL unter Wasserbelastung	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kontrolllösung, 300 mOsm/kg.....	19
Tabelle 2: Niedrig-NaCl-Lösung, 300 mOsm/kg.....	19
Tabelle 3: Kontrolllösung, 600 mOsm/kg.....	20
Tabelle 4: Niedrig-NaCl-Lösung, 600 mOsm / kg.....	20
Tabelle 5: Inkubationslösung	21
Tabelle 6: Sortierlösung	21
Tabelle 7: Gelfutterzusammensetzung für eine 100 g schwere Ratte	34
Tabelle 8: Erst-Antikörper	48
Tabelle 9: Zweit-Antikörper.....	49
Tabelle 10: Expressionsmuster.....	55
Tabelle 11: Intensität der Claudinfärbung.....	56

Abkürzungsverzeichnis

AQP: Aquaporin

aTL: aufsteigende dünne Schleife (*engl. ascending thin limb*)

ATP: Adenosintriphosphat

AVP: Arginin-Vasopressin

AVR: aufsteigende Vasa recta (*engl. ascending vasa recta*)

BSA: Serumalbumin von Rindern (*engl. bovine serum albumin*)

CD: Sammelrohr (*engl. collecting duct*)

ClCKa: Chloridkanal

Cldn: Claudin

CNT: Verbindungstubulus (*engl. connecting tubule*)

CsA: Cyclosporin A

DAPI: 4', 6-Diamidin-2-phenylindol

DCT: distales Konvolut (*engl. distal convoluted tubule*)

dDAVP: 1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin

DP: Diffusionspotential

dTL: absteigende dünne Schleife (*engl. descending thin limb*)

DVR: absteigende Vasa recta (*engl. descending vasa recta*)

ENaC: epithelialer Na⁺-Kanal im Sammelrohr (*engl. epithelial Na⁺ channel*)

GFR: glomeruläre Filtrationsrate

IM: inneres Nierenmark (*engl. inner medulla*)

IMaTL: aufsteigende dünne Schleife des inneren Nierenmarks (*engl. inner medullary ascending thin limb*)

IMCD: Sammelrohr des inneren Nierenmarks (*engl. inner medullary collecting duct*)

IMdTL: absteigende dünne Schleife des inneren Nierenmarks (*engl. inner medullary descending thin limb*)

IMTL: dünne Schleife des inneren Nierenmarks (*engl. inner medullary thin limb*)

I_{sc}: äquivalenter Kurzschlussstrom (*engl. equivalent short circuit current*)

ISOM: Innenstreifen des äußeren Nierenmarks (*engl. inner stripe of outer medulla*)

KG: Körpergewicht

LJP: Liquid-Junction-Potential

LSM: konfokales Lasermikroskop (*engl. laser scanning microscope*)

NCC: Na⁺-Cl⁻-Kotransporter (*engl. Na⁺-Cl⁻ cotransporter*)

NKCC2: Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporter (*engl. Na⁺-K⁺-Cl₂⁻ cotransporter*)

OSOM: Außenstreifen des äußeren Nierenmarks (*engl. outer stripe of outer medulla*)

P: Permeabilität

PBS-T: phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Triton (*engl. phosphate buffered saline with triton*)

PCT: proximales Konvolut (*engl. proximal convoluted tubule*)

PFA: Paraformaldehyd

PST: gerader Teil des proximalen Tubulus (*engl. proximal straight tubule*), S3-Segment

PT: Proximaler Tubulus

RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

TAL: dicke aufsteigende Schleife (*engl. thick ascending limb*)

te: transepithelial

TL: dünne Schleife (*engl. thin limb*)

TonE: Tonicity-Responsive-Enhancer (*engl. tonicity-responsive enhancer*)

TonEBP: Tonicity-Responsive-Enhancer-Binding-Protein (*engl. tonicity-responsive enhancer binding protein*)

1 Einleitung

1.1 Niere

1.1.1 Histologischer Aufbau

Zum Verständnis der in den folgenden Kapiteln erläuterten Experimente und deren Ergebnisse ist es zunächst von großer Bedeutung, den Aufbau der Niere zu kennen.

Die Niere gliedert sich grob in Rinde und Mark, das wiederum in einzelne Pyramiden gegliedert ist. Von diesen Einheiten aus Rinde und Markpyramide gibt es in der menschlichen Niere meist sechs bis acht und in der Ratte, welche als Versuchstier diente, nur eine. Die Spitze einer solchen Markpyramide nennt sich Papille und mündet im Nierenbecken, von wo aus der Harn über die ableitenden Harnwege nach außen gelangt (68).

Für die Harnkonzentrierung und die zahlreichen anderen Aufgaben der Niere stehen Funktionseinheiten zur Verfügung: die Nephrone. Ein Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen (*lat. Glomerulum*) und einer Aneinanderreihung unterschiedlich funktionierender Nierenkanälchen (*lat. Tubuli renales*). Die Endstrecke bildet das Sammelrohr (*engl. collecting duct, CD*). Es hat Verbindung zu etwa elf Nephrone und mündet im Nierenbecken (68).

Die Nierenkanälchen (Abbildung 1) bestehen vom Glomerulum bis zum Sammelrohr aus dem proximalen Tubulus mit Pars convoluta (*engl. proximal convoluted tubule, PCT*) und Pars recta (*proximal straight tubule, PST*), der dünnen absteigenden Schleife (*engl. descending thin limb, dTL*), der aufsteigenden dünnen Schleife (*engl. ascending thin limb, aTL*), der dicken aufsteigenden Schleife (*engl. thick ascending limb, TAL*), dem distalen Konvolut (*engl. distal convoluted tubule, DCT*) und dem Verbindungstubulus (*engl. connecting tubule, CNT*). PST, dTL, aTL und TAL bilden die sogenannte Henle-Schleife.

Übergänge der einzelnen Segmente gliedern Rinde und Mark. Glomeruli, PCT und DCT befinden sich nur in der Rinde. Das Mark wiederum kann weiter in äußeres Mark mit Außen- und Innenstreifen (*engl. outer stripe of outer medulla, OSOM* und *engl. inner stripe of outer medulla, ISOM*) und inneres Mark (*engl. inner medulla, IM*) unterteilt werden. Der Übergang von OSOM in ISOM zeichnet sich durch den Wechsel von PST in dTL aus, der von ISOM in IM durch den Wechsel von aTL in TAL. Im ISOM sind also lediglich dTL vorhanden (Abbildung 1: Darstellung eines Nephrons. Zusätzlich können Nephrone mit langen und kurzen Schleifen unterschieden werden (68).

Ebenso verlaufen im inneren Mark ab- und aufsteigende Gefäßschleifen (*lat. Vasa recta*), die für das Gegenstromprinzip (s. Kapitel 1.1.4.1) und damit für die Harnkonzentrierung unerlässlich sind (23).

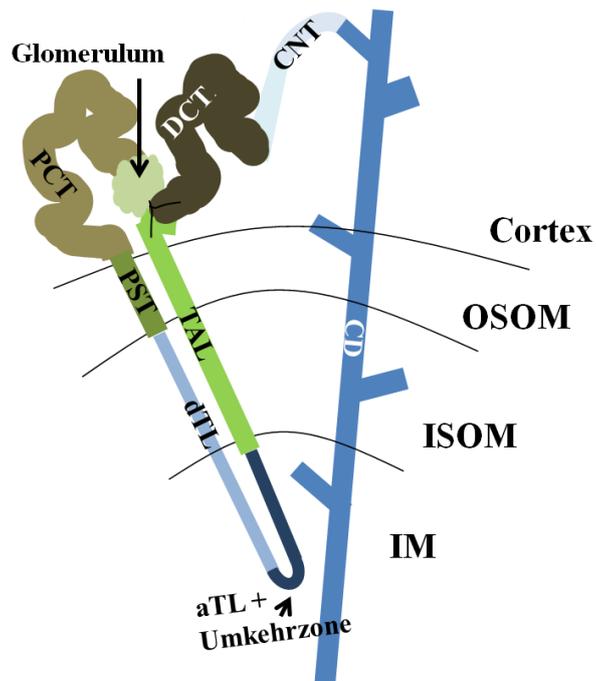


Abbildung 1: Darstellung eines Nephrons

In den unterschiedlichen Farben sind die einzelnen Abschnitte eines Nephrons dargestellt sowie die einzelnen Zonen (Cortex, OSOM, ISOM, IM) voneinander abgegrenzt. Das Nephron beginnt mit dem Glomerulum, dem sich PCT, PST, dTL, aTL, TAL, DCT, CNT und Sammelrohr anschließen. Das Sammelrohr ist die Endstrecke mehrere Nephrene.

1.1.2 Epithelialer Transport der Tubulussegmente

Die einzelnen Segmente sind Teil der Funktionseinheit Nephron und für die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, die Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts, die Blutdruckeinstellung, die Produktion von Hormonen und den Abbau von Peptidhormonen verantwortlich. Sie spielen nicht zuletzt eine Rolle bei Syntheseleistungen, wie z.B. Gluconeogenese. Tubuli bestehen aus Epithelien, d.h. Zellverbände aus polar gebauten Zellen, die als Oberflächenepithelen grenzbildend zwischen dem Lumen (dem Inneren der Segmente) nutzen. Die transzellulären Transportvorgänge nutzen meist zuvor aktiv etablierte Konzentrationsunterschiede und elektrische Gradienten (57), z.B. einen luminalen

Natriumkanal, der den Natriumgradienten durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nutzt, wie beispielhaft in Abbildung 2 an der oberen Zelle gezeigt. Dadurch entsteht ein lumen negatives Potential, das auch messtechnisch erfasst werden kann. Der parazelluläre Transport findet hierbei passiv entlang eines Konzentrationsgradienten oder für geladene Teilchen zusätzlich elektrisch durch die Triebkraft der Ladungen statt. Die Zellen lassen sich wiederum in ein lumenales Kompartiment und ein basolaterales Kompartiment gliedern. Die Kompartimente sind durch Schlussleisten (*engl. tight junctions*, TJ) voneinander getrennt, die den parazellulären Transport z.B. durch Anionenselektivität mitbestimmen. Dadurch werden bei einem lumen negativen Potential (Abbildung 2) Anionen resorbiert, aber Kationen nur in sehr viel geringerem Maße sezerniert. Für unser Beispiel bedeutet dies, dass Cl^- parallel zu Na^+ resorbiert, letzteres aber an der Rückdiffusion gehindert wird. Um die Selektivität des parazellulären Weges zu untersuchen, können experimentell Konzentrationsgradienten angelegt werden, die zur Etablierung eines Diffusionspotentials führen, das wiederum gemessen werden kann (41, 57).

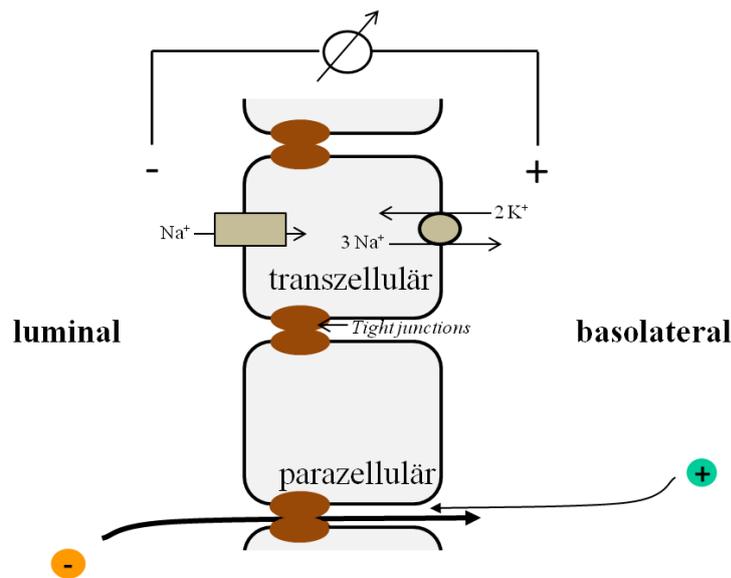


Abbildung 2: Darstellung der epithelialen Transportmechanismen und deren elektrophysiologische Messung

Epithelzellen im Verbund. Obere Zelle: transzellulärer Transport über einen Konzentrationsunterschiede nutzenden Kanal in der luminalen Membran und eine Pumpe in der basolateralen Membran. Die Resorption von Na^+ führt zu einem lumen negativen transepithelialen Potential. Über die anionenselektive TJ werden vermehrt Anionen und nur in geringem Maße Kationen sezerniert.

Im Folgenden wird eine kurze Zusammenfassung der Funktionen der einzelnen Segmente eines Nephrons mit besonderem Augenmerk auf den für diese Arbeit relevanten Ionen- und Wassertransport gegeben.

1.1.2.1 Proximaler Tubulus

Im proximalen Tubulus wird der im Glomerulum abfiltrierte Primärharn bereits grundlegend modifiziert. Essentielle Metabolite wie z.B. Glucose und Aminosäuren werden zurückgewonnen, toxische Stoffe sezerniert und Wasser und Elektrolyte nahezu isoosmotisch zu etwa 60% reabsorbiert. Die abschließend das Mark erreichende luminale Flüssigkeit besitzt somit, was die Elektrolytzusammensetzung angeht, immer noch weitgehend plasmaähnliche Eigenschaften (57).

1.1.2.2 Dünne Schleifen

Die Zellen der dünnen Schleifen sind flach und besitzen wenige Mitochondrien (37). Sie erlauben vornehmlich passive Transportvorgänge durch die Nutzung bestehender Konzentrationsgradienten.

Die dTL lässt sich entlang der medullären Achse nochmals unterteilen. Die dTL der kortikalen Nephrene erreichen das innere Mark (57). Bei den dTL, die in die IM absteigen, findet im proximalen Teil (die ersten 40%) vornehmlich Wassertransport statt (Abbildung 3). Hier ist der Wasserkanal Aquaporin 1 (AQP1) exprimiert. In den restlichen, tieferreichenden 60% findet sehr geringe Wasserreabsorption statt (23), dafür wird hier bereits der Chloridkanal CLC-Ka (Bezeichnung in der Ratte: CLC-K1) exprimiert. dTL besitzen zudem in der Nähe des Übergangs von ISOM zu IM den Harnstoff-Transporter UT-A₂ (65). Insgesamt zeigt die dTL eine hohe Permeabilität für Harnstoff, wobei noch nicht alle Transportmechanismen geklärt sind (76).

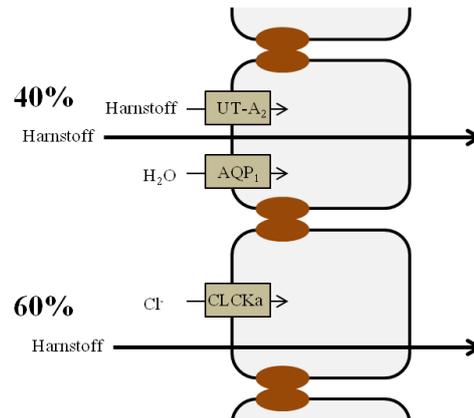


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Transportmechanismen in der dTL

Die obere Zelle dient als Beispiel für die Zellen der proximaleren 40% der dTL. Hier ist AQP₁ exprimiert. Zu beachten ist, dass der hier gezeigte Harnstoff-Transport über UT-A₂ nicht auf den ganzen 40% stattfindet sondern nur am Übergang ISOM zu IM. Auf welchem Weg der weitere Harnstoff-Transport stattfindet, ist nicht geklärt. Die untere Zelle steht für die Zellen der letzten 60% der dTL, in dem kein Wassertransport stattfindet. Zu beachten ist auch hier, dass CLC-Ka nicht in den gesamten letzten 60% vorkommt, sondern erst weiter distal auftritt.

Die aufsteigende dünne Schleife (Abbildung 4) exprimiert ähnlich zu dem letzten Teil der dTL den Cl⁻-Kanal CLC-Ka, ist jedoch wasserundurchlässig (23). In der aTL gibt es keinen Harnstoff-Transporter, aber dennoch eine hohe Permeabilität für Harnstoff (76). Parazellulär wird Na⁺ reabsorbiert (100).

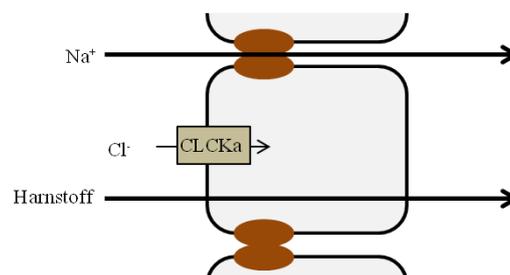


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Transportmechanismen in aTL

Zelle aus dem Epithel der aTL: Der Cl⁻-Transport transzellulär sowie der parazelluläre Na⁺-Transport folgen Konzentrationsgradienten. Auf welche Weise Harnstoff transportiert wird, ist nicht geklärt.

Dünne Schleifen, Vasa recta und Sammelrohre stehen in einem engen räumlichen und funktionellen Zusammenhang.

1.1.2.3 Dicke aufsteigende Schleife

Die TAL wird auch als Verdünnungsegment bezeichnet, da sie einerseits, wie die aTL wasserdicht ist, aber andererseits durch aktiven NaCl-Transport die luminalen NaCl-Konzentration deutlich erniedrigt. Sie spielt dadurch eine wichtige Rolle in der Konzentrierung (57).

1.1.2.4 Distales Konvolut

Das distale Konvolut spielt im Mechanismus der Harnkonzentrierung eine untergeordnete Rolle. Durch NaCl-Reabsorption übernimmt Harnstoff die Hauptrolle als Osmolyt (23).

1.1.2.5 Sammelrohr

Der Verbindungstubulus und das kortikale und frühmedulläre Sammelrohr ähneln sich vom Aufbau (Abbildung 5). Hier finden sich Hauptzellen und Schalt- bzw. Zwischenzellen. In der inneren Medulla, auf der hier das Augenmerk liegt, finden sich kaum Schaltzellen (21), die vornehmlich der Homöostase des Säure-Base-Haushalt dienen.

Die Hauptzellen sind für die Regulation des Salz- und Wasserhaushalts zuständig. Zahlreiche Hormone wie Aldosteron, AVP und Atriopeptin können hier regulatorisch angreifen. Die Hauptzellen im späten distalen Tubulus, Verbindungstubulus und Sammelrohr besitzen für die Regulation des Salzhaushalts einen luminalen Na^+ -Kanal (*engl. epithelial Na^+ -channel, ENaC*), der durch Aldosteron, AVP und Atriopeptin gesteuert sowie durch Amilorid gehemmt werden kann. Eine Na^+/K^+ -ATPase dient dem Aufbau des Membranpotentials. Das durch Na^+ -Transport lumenegative Potential ermöglicht einen Cl^- -Transport parazellulär (57).

Im Verbindungstubulus und im Sammelrohr findet sich der Wasserkanal Aquaporin 2 (AQP2) in der luminalen Membran. In beiden Segmenten sind AQP3 und AQP4 basolateral zu finden (22). Die Wasserkanäle lassen sich durch AVP steuern (hauptsächlich AQP2).

Harnstofftransport findet im Sammelrohr ebenfalls über Transporter statt. Hierfür stehen der UT-A_1 und der UT-A_3 zur Verfügung (12), die ebenfalls durch AVP reguliert werden (5).

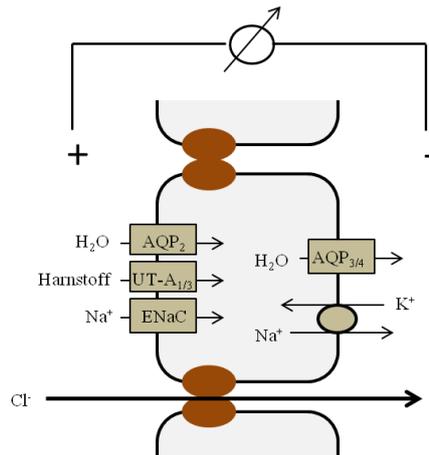


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Transportmechanismen im Sammelrohr

Die Sammelrohrzelle zeigt die im Text erläuterten Transportmechanismen. Luminal befindet sich AQP2, während Wasser basolateral über AQP3 und 4 diffundiert. Harnstofftransport wird über UT-A_{1/3} erleichtert, während der Salzhaushalt über transzelluläre Na⁺-Reabsorption via ENaC und parazelluläre Cl⁻-Diffusion reguliert wird. Angetrieben wird dieser Transport durch die basolaterale Na⁺-K⁺-ATPase.

1.1.3 Claudine und Tight Junctions

Tight Junctions (*lat. Zonula occludens* = Verschlusszone) dienen der Regulation des parazellulären Transportwegs für Wasser, hydrophile Moleküle und Ionen (68). Sie bestehen aus den Transmembranproteinen Claudin, Occludin, Tricellulin, MarvelD3 (105) sowie weiteren cytoplasmatischen Gerüstproteinen und Signalproteinen (46). Die Claudine (21-28 kDa) sind hierbei ausschlaggebend für die Abdichtung oder Durchlässigkeit des parazellulären Weges. Einige spezialisierte Claudine sind in der Lage Poren zu bilden und die Selektivität für einzelne Ionen zu beeinflussen (40, 68, 95, 101). Die Familie der Claudine besteht aus bis bisher 27 bekannten Typen (114), die unterschiedliche Eigenschaften und Lokalisation im menschlichen Körper besitzen (40).

Die Claudine bestehen aus vier Transmembrandomänen (Abbildung 6), zwei extrazellulären Schleifen (*engl. extracellular loop, ECL*), einer zytoplasmatischen und einem amino- bzw. carboxyterminalen Ende (46). Die erste extrazelluläre Schleife (50 Aminosäuren) ist bestimmend für die Ionenselektivität und enthält positiv oder negativ geladene Aminosäuren. Sie beinhaltet außerdem eine konservierte Aminosäure-Abfolge, das GLWCC-Motiv (46). Die zweite extrazelluläre Schleife besteht aus ca. 25 Aminosäuren mit einem „*helix-turn-helix*“-Motiv (*engl. helix*: Spirale; *engl. turn*: Wendung) und ist bedeutend für die trans-Interaktion von Claudinen (46, 81). Claudine sind sowohl in der Lage Komplexe mit benachbarten Zellen

(trans-Interaktion), als auch Komplexe innerhalb einer Zelle zu bilden (cis-Interaktion).

Verschiedene posttranslationale Modifikationen wie Palmitoylierung und Phosphorylierung finden an den cytoplasmatischen Domänen statt. Für die Palmitoylierung (an Cysteinen: CXXC-Motiv) sind Auswirkung auf die Lokalisation, und für die Phosphorylierung Auswirkung auf die Ionenselektivität von Tight Junctions beschrieben worden (46). Des Weiteren gibt es zahlreiche andere Regulationswege von Tight Junctions auf Ebene der Transkription, durch Gerüstproteine oder Interaktionen mit anderen Claudinen (40).

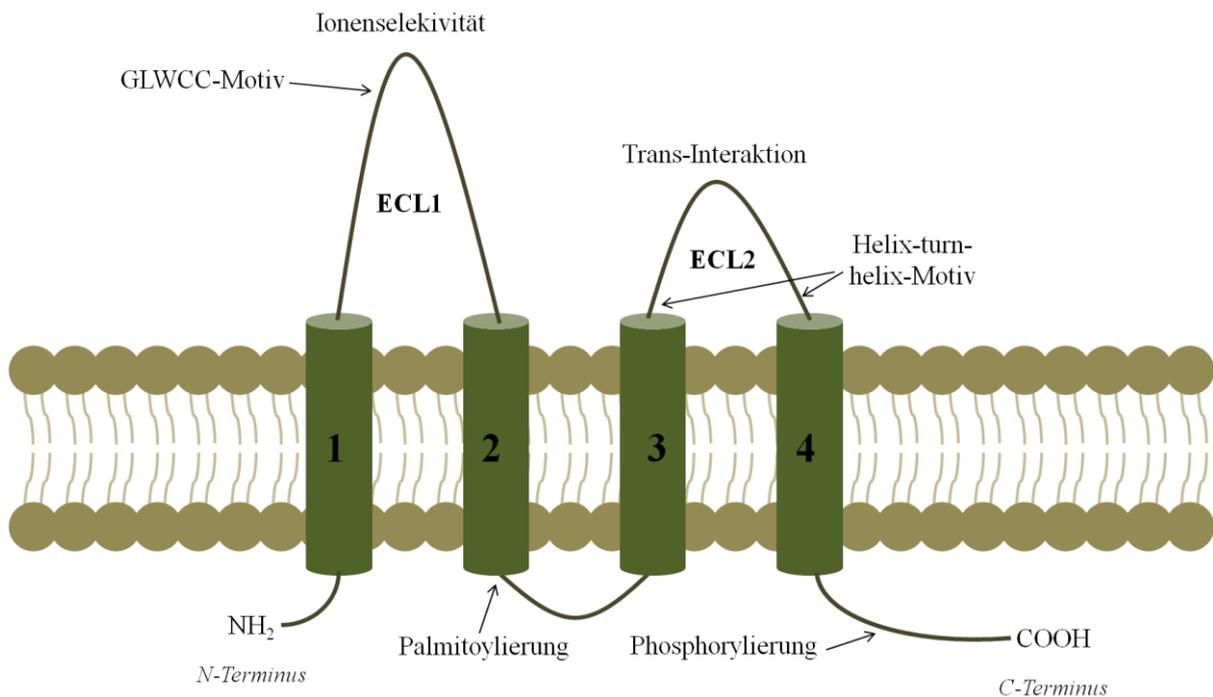


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Claudins

Zu sehen sind die vier Transmembrandomänen eines Claudins und die zwei extrazellulären (ECL1 und ECL2) sowie die cytoplasmatische Schleife. Markiert sind neben wichtigen, spezifischen Motiven sowohl der N-Terminus, als auch der C-Terminus und Orte der Phosphorylierung und Palmitoylierung, die zur Regulation verwendet werden.

Tight Junctions werden einerseits klassifiziert in Poren-bildende und Barriere-formende Tight Junctions je nachdem, ob sie den transepithelialen Widerstand erniedrigen (Ionentransport) oder erhöhen (Abdichtung). Die porenbildenden TJ können wiederum nach ihrer Präferenz für Anionen oder Kationen eingeteilt werden. Sie können ebenfalls regulieren, bis zu welcher Größe Teilchen durchgelassen werden (40).

Je nach Durchlässigkeit der Tight Junctions wird unterschieden zwischen lecken Epithelien wie z.B. im proximalen Tubulus und dichten Epithelien wie z.B. im Sammelrohr. Dementsprechend

nimmt die Expression von Occludin, zuständig für TJ Stabilität (11, 20), sowie von ZO-1 und ZO-2 als wichtige Signaltransduktoren (40) vom proximalen Tubulus bis Sammelrohr zu (34). Occludin scheint hierbei direkt in Verbindung mit der TJ-Komplexität und dem zunehmenden Widerstand zu stehen, während ZO-1 und ZO-2 indirekt mit dem Einbau der TJs und der Barrierefunktion in Zusammenhang zu stehen scheinen (34). Die Claudine lassen sich in vornehmlich abdichtende und Anionen- oder Kationenporen bildende aufteilen (46). In den folgenden Unterkapiteln wird näher auf die in der Dissertation untersuchten Claudine und ihre bisher bekannten Eigenschaften eingegangen.

1.1.3.1 Claudin 2

Claudin 2 ist in der Niere im proximalen Tubulus und in der oberen Hälfte der dünnen absteigenden Schleife zu finden. Es gehört zu den Poren-bildenden Claudinen und erhöht die Selektivität für Kationen (40). Einzig für Claudin 2 konnte bisher eine Durchlässigkeit für Wassermoleküle gezeigt werden (85). Das Modell einer Claudin 2-Knockout-Maus zeigt eine Verringerung der Na⁺-Leitfähigkeit (73). Weitere Durchlässigkeit besteht unter anderem für K⁺ und Ca²⁺ (115).

1.1.3.2 Claudin 3

Claudin 3 ist in der aTL, der TAL, im DCT und im CD (46) lokalisiert und verhält sich Barriereformend unabhängig von der Ladung der Teilchen (71).

1.1.3.3 Claudin 4

Claudin 4-Expression findet sich in dTL (75), aTL und CD (46). In verschiedenen Experimenten wurde Claudin 4 sowohl als Poren-bildend für Cl⁻ (49) als auch als Barriereformend für Na⁺ beschrieben (104). Gleichzeitig scheint eine Beeinflussung von Claudin 4 durch Aldosteron mit Erhöhung der Cl⁻-Permeabilität möglich (61). Zudem ist bekannt, dass Claudin 4 bei erhöhter Urinosmolalität vermehrt in der Zellmembran zu finden ist (60). Ohne die zusätzliche Expression von Claudin 8 scheint Claudin 4 jedoch nicht funktionsfähig zu sein (49).

1.1.3.4 Claudin 7

Claudin 7 ist in dTL, DCT, CNT und CD zu finden (46). Die bisherigen Forschungsergebnisse sind jedoch nicht einheitlich. In Zellkulturexperimenten wurde Claudin 7 einerseits als Barriere-formend für Cl^- sowie Poren-bildend für Na^+ (1) und andererseits als das genaue Gegenteil beschrieben (44). Von Günzel und Yu (40) wird die Hypothese favorisiert, dass Claudin 7 vornehmlich Cl^- -Poren bildet, da in DCT, CNT und CD der Cl^- -Transport als primär parazellulär angenommen wird, im Gegensatz zum primär transzellulären Na^+ -Transport. Claudin 7-Knockout führt zu Verlust von Na^+ , Cl^- und K^+ (103).

1.1.3.5 Claudin 8

Claudin 8 kommt wie Claudin 7 in dTL, DCT, CNT und CD vor (46). Es bildet im CD einen Komplex mit Claudin 4 (49) und wird als Barriere-formend für Na^+ (116) sowie als Poren-bildend für Cl^- beschrieben und ist somit anionenselektiv. Claudin 8 kann zudem im distalen Kolon durch Aldosteron hochreguliert werden (2).

1.1.3.6 Claudin 10

Bei Claudin 10 muss zunächst zwischen zwei Isoformen unterschieden werden: Claudin 10a und Claudin 10b, wobei Claudin 10a als anionen-selektiv und Claudin 10b als kationenselektiv beschrieben wurde (106). Nicht für alle Nephronabschnitte ist bekannt, welche der beiden Isoformen vorzufinden ist. Im PT findet sich Claudin 10a (14). Für die TL ist eine Expression nur für die aTL beschrieben, wobei nicht völlig geklärt ist, welche Isoform vorliegt (70). In der TAL findet man eine sehr hohe Expression von Claudin-10b, und aus Studien an einem Knock-Out Mausmodell ist bekannt, dass Claudin-10b hier eine Na^+ -Pore bildet (14, 70). Auch in DCT, CNT und CD ist eine Claudin 10 Expression beschrieben worden, jedoch auch hier ohne bekannte Zuordnung zu einer der Isoformen (39, 46, 106).

1.1.3.7 Claudin 16

Claudin 16 kommt in aTL und in TAL sowie DCT und kortikalem CD vor (46, 110). Die Eigenschaften von Claudin 16 sind bisher nicht vollständig verstanden. Mutationen in Claudin 16 und auch 19 führen zu der autosomal rezessiven Krankheit FHHNC (*engl. familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis*). Das deutet auf eine Bedeutung von Claudin 16 bei der Reabsorption der divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} hin (58, 97). Experimentell konnte die Porenbildung für divalente Kationen nicht eindeutig gezeigt werden

(38, 45). Eine Möglichkeit der Regulation könnte die Porenbildung für Na^+ zur Ausbildung des lumenpositiven Potentials sein, welche zu einer Reabsorption der divalenten Kationen führen könnte (48, 93). In Claudin 16-Knockout Mäusen konnte ebenfalls eine Hyperkalziurie und Hypomagnesiämie gezeigt werden, allerdings keine Nephrokalzinose, was auf Kompensationsmechanismen schließen lässt. Isoliert perfundierte TAL dieser Knockout-Tiere zeigten eine Reduktion der Mg^{2+} - und Ca^{2+} - Permeabilität, allerdings keine Veränderung der Na^+ -Permeabilität (111). Eine weitere Möglichkeit der Regulation könnte die Veränderung der Cl^- -Permeabilität durch Claudin 16 sein, welche wiederum die Reabsorption der divalenten Kationen steigert (38). Es ist also noch nicht vollständig geklärt ob die Veränderung der Permeabilität für Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} oder Ca^{2+} für die Hyperkalziurie und Hypomagnesiämie alleine verantwortlich ist oder vielleicht sogar mehrere dieser Prozesse eine Rolle spielen. Claudin 16 bildet einen Komplex mit Claudin 19, welcher durch Interaktion mit dem regulatorischen Claudin 14 modifiziert werden kann (33).

1.1.3.8 Claudin 19

Claudin 19 ist in aTL, TAL und DCT lokalisiert (40, 58). Es bildet einen Komplex mit Claudin 16 und Mutationen von Claudin 19 führen ebenfalls zu FHHNC (58). Es ist Barriere-formend, wobei nicht klar ist, ob für Kationen (4) oder Anionen (48). Es scheint im Komplex mit Claudin 16 für die Erhöhung der Na^+ -Selektivität wichtig zu sein und somit für die Reabsorption der divalenten Kationen (47, 48).

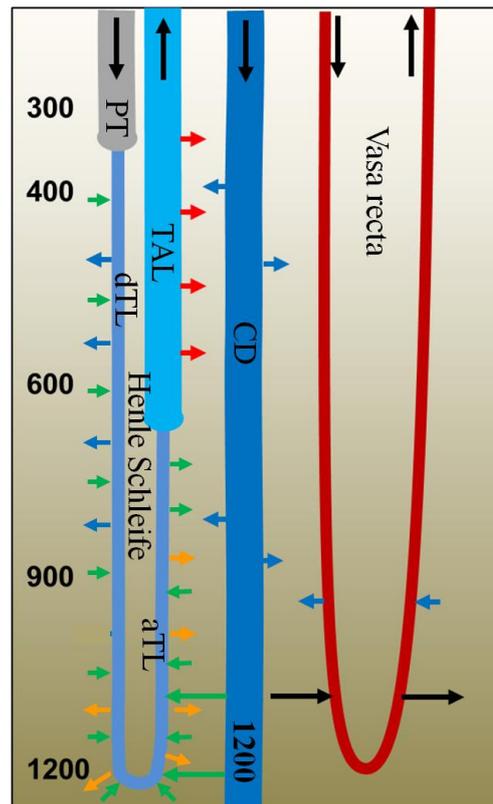
1.1.4 Konzentrierungsmechanismen

1.1.4.1 Harnkonzentrierung und das Gegenstromprinzip

Je nach den Bedürfnissen des Körpers ist die menschliche Niere in der Lage, den Urin bis zu einer Osmolalität (= Konzentration osmotisch wirksamer Teilchen pro kg H_2O) von 1300 mOsm/kg zu konzentrieren oder bis auf 50 mOsm/kg zu verdünnen. Ratten haben sogar eine sehr viel höhere Konzentrierungsfähigkeit und können den Urin deutlich über 3000 mOsm/kg konzentrieren. Wird der Harn konzentriert spricht man von Antidiurese, die Ausscheidung von verdünntem Urin wird als Wasserdiurese bezeichnet. Die Harnkonzentrierung unterliegt einer strengen Regulation. Bereits im proximalen Tubulus wird der größte Teil des Wassers rückresorbiert, allerdings findet die Feinregulation, soweit bekannt, erst weiter distal im CNT und CD statt. Um die Resorption von Wasser bis zu einer Urinkonzentration von 1300 mOsm/kg zu gewährleisten, wird von der Rinde bis zur Papille des inneren Marks ein

kortikomedullärer osmotischer Gradient mit einer steigenden Osmolalität von 290 mOsm/kg in der Rinde bis 1300 mOsm/kg in der Papillenspitze aufgebaut. Für den Aufbau des osmotischen Gradienten ist das Gegenstromprinzip von entscheidender Bedeutung (Abbildung 7). Bei Durchfluss durch die Henle-Schleife fließt der Harn im absteigenden und im aufsteigenden Teil entgegengesetzt. In der TAL findet eine aktive $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -Reabsorption statt (Abbildung 7, rote Pfeile), während sie undurchlässig für Wasser ist. Somit nimmt die Osmolalität im Lumen ab und im Interstitium zu. Im Gegensatz zum aufsteigenden Teil der Henle Schleife ist der absteigende Teil mit PST und den ersten 60% der dTL wasserdurchlässig (Abbildung 7, blaue Pfeile). Durch die Erhöhung der Osmolalität im Interstitium gelangt das Wasser durch AQP1 dorthin. Da der Urin mit einer gewissen Geschwindigkeit durch die Henle-Schleife fließt, kommt dieser an einem immer hypertonen Interstitium schleifenabwärts und an einem Interstitium mit sinkender Osmolalität schleifenaufwärts vorbei, was eine schrittweise Erhöhung des kortikomedullären osmotischen Gradienten ermöglicht. Es kommt also durch den aktiven Transport in der TAL nicht nur zu einem Angleich der Osmolalität, sondern sogar zu einer Erhöhung. Dies wird Gegenstrom-Multiplikation genannt (57). Durch die Reabsorption von Wasser distal der TAL erhöht sich die Harnstoffkonzentration im Lumen. Im IMCD befindliche UT-A_1 und UT-A_3 bewirken einen Übertritt von Harnstoff ins Interstitium (Abbildung 7, grüne Pfeile) und in Folge zum Austritt von Wasser aus dem absteigenden Teil der Henle-Schleife. Dadurch erniedrigt sich die dortige NaCl -Konzentration und NaCl tritt innermedullär passiv aus der aTL aus (Abbildung 7, orange Pfeile), während Harnstoff durch die geringer Konzentration nach luminal diffundiert (Abbildung 7, grüne Pfeile). Ist die Durchlässigkeit für NaCl hoch und für Harnstoff gering, ist der Aufbau eines Gradienten möglich (23). So könnte sowohl innermedullär als auch in der äußeren Medulla die Erzeugung eines osmotischen Gradienten erklärt werden.

Durch diesen kortikomedullären osmotischen Gradienten und das Vorhandensein von AQP2 im Sammelrohr kommt es zur Resorption von Wasser (Abbildung 7, blaue Pfeile) und zur Feinregulierung der Urinosmolalität (57).



- H₂O
- NaCl, aktiv
- Gelöste Teilchen
- Harnstoff
- NaCl, passiv

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Harnkonzentrierung

Schematische Darstellung der Transportvorgänge in den einzelnen Nephronabschnitten unter Antidiurese: Über den „Motor“ in der TAL wird NaCl aktiv resorbiert (rote Pfeile) und der Primärharn verdünnt, während das Interstitium konzentriert wird. Durch die hohe Konzentration an Osmolyten im inneren Nierenmark gelangt in der dTL Wasser vom Lumen ins Interstitium (blaue Pfeile). Dadurch erniedrigt sich wiederum die NaCl-Konzentration im Interstitium und NaCl kann aus dem aTL-Lumen diffundieren (gelbe Pfeile), während Harnstoff durch seine hohe Konzentration im Interstitium in die andere Richtung diffundiert (grüne Pfeile). Auf diese Weise wird auch im inneren Nierenmark ein osmotischer Gradient aufgebaut. Im Sammelrohr kann über Einbau von AQP2 und Harnstofftransportern die Resorption von Wasser (blaue Pfeile) und Harnstoff (grüne Pfeile) reguliert erfolgen.

Dieser Mechanismus der Gegenstrom-Multiplikation, wie er in vielen Lehrbüchern erklärt ist, konnte so allerdings nur für das äußere Mark gezeigt werden. Im inneren Mark schlugen Modelle unter Annahme der bekannten Harnstoff-Permeabilität in aTL fehl (23).

Eine neuere Hypothese geht von einer wichtigen Bedeutung der dreidimensionalen Struktur von Gefäßen und Tubuli in der inneren Medulla aus (Abbildung 8). Hierbei gibt es Gruppierungen von CD, aTL und aufsteigenden Vasa recta (AVR). Vier AVR umgeben einen CD und CD und aTL liegen sich in interstitiellen Knotenpunkten (*engl. interstitial nodal space*) gegenüber, während jeweils links und rechts eine AVR verläuft. In diesen Bereichen soll es zu

einer Anreicherung von NaCl und Harnstoff kommen, welche über die AVR in weiter kortikal gelegene Gebiete transportiert werden und somit zur dortigen Konzentrierung führen. dTL und DVR (*engl. descending Vasa recta*) liegen außerhalb der Gruppierungen von CD, aTL und AVR. Es gibt viermal mehr AVR als DVR. AVR und aTL liegen sowohl in der Nähe von CD-Gruppierungen als auch außerhalb (Abbildung 8). Wichtig ist, dass die letzten 60% der dTL, welche sich ähnlich verhalten wie die aTL, ebenfalls bei den CD-Gruppierungen vorkommen und, dass kurz vor der Umkehrzone in die dTL anders als im zuvor erläuterten Gegenstromprinzip ebenfalls NaCl ins Interstitium übergeht. Zudem gibt es in der Papille Schleifen mit längerer transversaler Umkehrzone, aus denen ebenfalls NaCl ins Interstitium übertritt. Im Gegensatz zum weit verbreiteten Modell findet Harnstofftransport und -diffusion in dTL und dem Beginn der aTL lumenwärts und am Ende der aTL ins Interstitium statt (Abbildung 7, grüne Pfeile).

Dieses Modell ist zwar in der Lage eine höhere Urinosmolalität von ca. 1200 mOsm/kg (Ratte) zu generieren, erreicht die maximale Harnkonzentrierungsfähigkeit aber nicht ansatzweise und ist auch nicht in der Lage, den entsprechenden axialen Na⁺-Gradienten zu generieren (23).

Eine vollständige Erklärung für die Konzentrierungsmechanismen in der inneren Medulla ist also bis jetzt nicht gefunden.

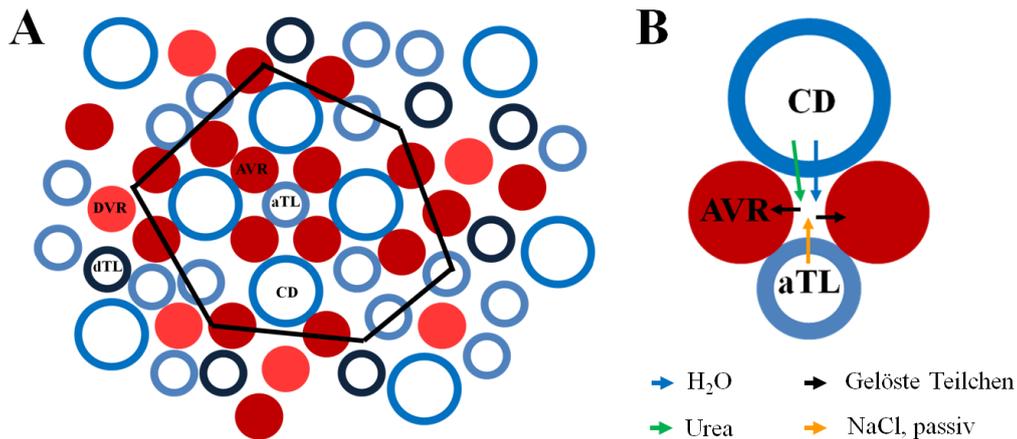


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Tubulianordnung in der inneren Medulla, modifiziert nach Dantzler 2014 (23)

Darstellung A zeigt die Anordnung der Tubuli in einer sogenannten Clusterregion, in welcher aTL (hellblauer Kreis), AVR (dunkelrot ausgefüllter Kreis) und CD (großer, mittelblauer Kreis) vorkommen, wobei CD und aTL sich gegenüberliegen und von zwei AVR eingerahmt werden (B). Ein CD in der Clusterregion ist von jeweils vier AVR umgeben. Die Clusterregion ist in A schwarz umrahmt. Außerhalb der Clusterregion befinden sich auch dTL (dunkelblauer Kreis) und DVR (hellrot ausgefüllter Kreis), wobei es wesentlich mehr AVR als DVR gibt. In B ist ein interstitieller Knotenpunkt aus der Clusterregion zu sehen. Vom CD wird Harnstoff (grüner Pfeil) und Wasser (blauer Pfeil) reabsorbiert, während die gegenüberliegende aTL NaCl (gelber Pfeil) reabsorbiert. Diese gelösten Teilchen werden dann durch die einrahmenden AVR nach kortikal transportiert.

1.1.4.2 Hormonelle Regulation

In dieser Doktorarbeit wurde die Auswirkung von zwei Hormonen auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von kultivierten Sammelrohrzellen getestet: AVP und Aldosteron.

AVP ist ein Peptidhormon des Hypophysenhinterlappens und hat unter anderem entscheidenden Einfluss auf die Wasserhomöostase. Es besitzt unterschiedliche Namen: Arginin-Vasopressin (AVP), antidiuretische Hormon (ADH), Adiuretin oder Vasopressin.

AVP wird bei Wassermangel aus dem Hypophysenhinterlappen ausgeschüttet (68). Wassermangel wird hierbei durch Osmorezeptoren im Hypothalamus oder bei Volumenverlust durch Barorezeptoren im rechten Vorhof und Aortenbogen gemessen (96). Für AVP gibt es zwei verschiedene Rezeptoren V1 und V2. Über V1 wirkt es vasokonstriktorisch (stellt die Blutgefäße eng), über V2 nimmt es u.a. Einfluss auf renalen Salz- und Wassertransport.

AVP führt zu einem vermehrten Einbau von AQP2 im Sammelrohr und führt dadurch zu einer vermehrten Wasserreabsorption unter Antidiurese (25).

Die Harnstoff-Transporter UT-A₁, -A₂ und A₃ werden ebenfalls von AVP stimuliert (55, 107,

109). So kommt es bei Wassermangel über die Ausschüttung von AVP zur vermehrten Harnstoffreabsorption, was wiederum die Osmolalität im inneren Nierenmark erhöht und somit die Reabsorption von Wasser fördert (s. Kapitel 1.1.4.1).

NaCl-Reabsorption über ENaC (6), NCC (72) und NKCC2 (59) werden ebenfalls durch AVP stimuliert.

Des Weiteren wurde eine erhöhte Permeabilität für den CLCKa der aTL unter Vasopressinstimulation gefunden (102).

Aldosteron spielt vor allem bei der Blutdruckregulation eine Rolle und wird durch das Renin-Angiotensin-System und die Plasma Kaliumkonzentration reguliert (57). Es führt zur vermehrten Na⁺-Reabsorption durch Stimulation von ENaC und NCC (86), zu einer erhöhten K⁺-Sekretion durch Steuerung der luminalen K⁺-Kanäle im Sammelrohr (ROMK) sowie zu einer Erhöhung der Zahl der Na⁺-K⁺-ATPasen (43, 80).

1.1.4.3 Zelluläre Osmoregulation

Im inneren Nierenmark herrschen extreme Bedingungen für die Zellen, die sich der hypertonen Umgebung anpassen müssen. Ohne Anpassungsmechanismen würde es zum Schrumpfen der Zellen durch Wasserverlust und schließlich zum Zelltod kommen. Eine weitere Herausforderung stellt die hohe NaCl-Konzentration dar, die zu DNA-Doppelstrangbrüchen, Oxidation von DNA und Proteinen sowie Zytoskelett-Veränderungen führen kann (25, 28, 117). Für die Anpassung an diese Bedingungen spielen nicht nur die Ionen, sondern auch ungeladene Teilchen wie Inositol, Sorbitol oder Betain als Osmolyte eine Rolle (18).

Nicht nur die Zelle allein, sondern auch das Epithel als Zellverband muss dem osmotischen Druck standhalten. Hierfür wird ein dichtes Epithel, wie es im Sammelrohr vorkommt, benötigt. Bei hypertonem Harn wird das Epithel durch vermehrten Einbau von Claudin 4 in die TJ dichter (60).

Die oben bereits erwähnte Synthese der Osmolyte wird durch den Transkriptionsfaktor TonEBP (*engl. Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein*) reguliert (29). Damit dieser bei hohen Urinosmolalitäten in den Zellkern gelangen kann, wird das osmoregulierte Kernprotein Nup88 (Nucleoporin 88) benötigt (3). Hier findet die Transkription und Bindung an die Bindungsstellen (*engl. Tonicity-response Ehancer*) der Gene statt (3).

Doch nicht nur Osmolyt-Synthese wird durch TonEBP gesteuert, sondern u.a. auch die Harnstoff-Transporter UT-A₁₊₃ (74).

Es gibt eine Reihe von Stoffen und Mechanismen, die die Osmoregulation über TonEBP und

seine Anwesenheit im Zellkern zu hemmen scheinen. Hierzu gehören MG-132 (Proteasominhibitor), PKAc-Inhibitor (Proteinkinase A-Inhibitor) oder Cyclosporin A (10, 29).

1.1.4.4. Cyclosporin A

Cyclosporin A (CsA) ist ein Peptid, gewonnen aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum*, das u.a. als Immunsuppressivum zur Vorbeugung von Transplantatabstoßungen genutzt wird. Es besitzt zahlreiche Nebenwirkungen wie z.B. die Nephrotoxizität. Diese könnte neben anderen Gründen auch an der Hemmung der Osmolalitätsanpassung im inneren Nierenmark liegen. In der Literatur werden verschiedene Wege diskutiert, über die Cyclosporin A in die Osmolalitätsanpassung der Zellen im inneren Nierenmark eingreift. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Cyclosporin A basieren auf seinem direkten Einfluss auf TonEBP. Es wurde hypothesiert, dass Cyclosporin A die Translokation von TonEBP in den Zellkern über die Hemmung der Phosphatase Calcineurin hemmt (88, 94) und somit direkt die Osmolalitätsanpassung der Zellen verhindert.

1.2 Zellkulturmodell

In der Arbeit wurden zwei Modelle für die Charakterisierung der Tubuluszellen bzw. Segmente in der inneren Medulla verwendet: Zum einen ein Zellkulturmodell, zum anderen ein Tierversuchsmodell.

Für die *in vitro*-Versuche am Zellkulturmodell wurden primärkultivierte IMCD-Zellen (*engl. Inner Medullary Collecting Duct*) von Ratten genutzt. Hierbei handelt es sich um eine gut etablierte Primärzellkultur (69, 87, 99), die nach Kultivierung elektrophysiologisch in der Ussing-Kammer untersucht wurde. Die geringe Zeit in der Kultur von durchschnittlich 6 Tagen ermöglichte ein natives Zellmodell mit möglichst identischen Zelleigenschaften zu der Situation *in vivo*. Studien haben gezeigt, dass die Kultivierung auf Filtermembranen zu einer polaren Ausrichtung der Zellen und der Ausbildung eines geschlossenen einschichtigen Epithelverbands (Monolayer) führt (83, 87).

1.3 Zielsetzung der Doktorarbeit

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die funktionelle Charakterisierung des parazellulären Transportwegs der in der inneren Medulla gelegenen Nephronabschnitte. Zu diesen Nephronabschnitten zählen:

- absteigende dünne Schleifen
- aufsteigende dünne Schleifen
- Sammelrohre.

Hierfür stand der bereits beschriebene *in vitro* Ansatz der IMCD-Kulturen sowie ein *ex vivo* Ansatz, bei dem frisch isolierte Tubuli perfundiert und elektrophysiologisch untersucht wurden, zur Verfügung. Außerdem wurde die Beeinflussbarkeit des parazellulären Transportwegs durch Veränderung des Zellkulturmediums, durch Hormone und Pharmaka (IMCD-Kultur) sowie durch Hydratationszustand bzw. Urinosmolalität (*ex vivo*-Untersuchung) gemessen. Zur Analyse möglicher Regulationsvorgänge auf Proteinebene wurden Claudinexpressionsanalysen mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die im Folgenden verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland). Bei anderweitiger Herkunft wird die Firma gesondert erwähnt.

2.2 Lösungen

Tabelle 1: Kontrolllösung, 300 mOsm/kg

Kontrolllösung (300 mOsm/kg)	
Stoff	Konzentration in mM
NaCl	145
KH ₂ PO ₄	0,4
K ₂ HPO ₄	1,6
Glucose	5
MgCl ₂	1
Ca-Gluconat	1,3

Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf 7,4 und die Osmolalität durch Zugabe von Mannitol auf 300 mOsm/kg eingestellt.

Tabelle 2: Niedrig-NaCl-Lösung, 300 mOsm/kg

Niedrig-NaCl-Lösung (300 mOsm/kg)	
Stoff	Konzentration in mM
NaCl	30
KH ₂ PO ₄	0,4
K ₂ HPO ₄	1,6
Glucose	5
MgCl ₂	1

Mannitol	230
Ca-Gluconat	1,3
Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf 7,4 und die Osmolalität durch Zugabe von Mannitol auf 300 mOsm/kg eingestellt.	

Tabelle 3: Kontrolllösung, 600 mOsm/kg

Kontrolllösung (600 mOsm/kg)	
Stoff	Konzentration in mM
NaCl	245
KH₂PO₄	0,4
K₂HPO₄	1,6
Glucose	5
MgCl₂	1
Ca-Gluconat	1,3
Harnstoff	100
Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf 7,4 und die Osmolalität durch Zugabe von Mannitol auf 600 mOsm/kg eingestellt.	

Tabelle 4: Niedrig-NaCl-Lösung, 600 mOsm / kg

Niedrig-NaCl-Lösung (600 mOsm/kg)	
Stoff	Konzentration in mM
NaCl	50
KH₂PO₄	0,4
K₂HPO₄	1,6
Glucose	5
MgCl₂	1
Mannitol	300
Ca-Gluconat	1,3
Harnstoff	100
Der pH-Wert wurde mit 1N NaOH-Lösung auf 7,4 und die Osmolalität durch Zugabe von Mannitol auf 600 mOsm/kg eingestellt.	

Tabelle 5: Inkubationslösung

Inkubationslösung (600 mOsm/kg)	
Stoff	Konzentration in mg/100 ml
Deferoxamin	6,6
DNase I	2,5
Glycin	37,5
Trypsininhibitor	4,8
Die Stoffe wurden in Kontrollösung, 600 mOsm/kg, gelöst.	

Tabelle 6: Sortierlösung

Sortierlösung (600 mOsm/kg)	
Stoff	Konzentration in mg/100 ml
Deferoxamin	6,6
DNase I	2,5
Glycin	37,5
Trypsininhibitor	4,8
Albumin	25
Die Stoffe wurden in Kontrollösung, 600 mOsm/kg, gelöst.	

2.3 IMCD-Primärzellkultur

Die Methode der Kultivierung wurde von PD Dr. Bayram Edemir, der zu diesem Zeitpunkt (2013) am Nephrologischen Institut in Münster tätig war, übernommen (Annalisa Ziemens, persönliche Mitteilung).

2.3.1 Versuchstiere

Für die Kultivierung der IMCD-Zellen wurden 200-300g schwere weibliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet.

2.3.2 Präparation des inneren Nierenmarks

Zu Beginn der Präparation wurden die Tiere narkotisiert (Isofluran, 5 Vol%) (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und nachfolgend zügig dekapitiert. Anschließend wurde der Bauchraum mit sterilem Operationsbesteck eröffnet, beide Nieren entnommen und in eisgekühltes PBS (engl.: phosphate buffered saline; PAN-Biotech GmbH,

Aidenbach, Deutschland) überführt. Die weiteren Präparationsschritte fanden an einer Sicherheitswerkbank (HERA safe, Thermo Scientific, Waltham, USA) statt. Nach Entfernung der Nierenkapsel mit Hilfe zweier Pinzetten wurden die Nieren mit einer Rasiermesser Klinge (C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland) mit einem paramedianen Längsschnitt geteilt und das weiß erscheinende innere Nierenmark entnommen. Hierauf folgte eine mechanische Zerkleinerung dieser Nierenbestandteile mittels einer zweiten Rasiermesser Klinge (Gebrüder Martin GmbH und Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) in einigen Tropfen PBS.

2.3.3 Aufreinigung der Primärzellen

Eine Enzymlösung aus 2,2 mg/ml Kollagenase II (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) und 2 mg/ml Hyaluronidase Typ I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland) wurde vor der Nierenmarkpräparation unter der Sicherheitswerkbank steril hergestellt. Hierfür wurden die Enzyme in 1 ml PBS gelöst und anschließend durch ein Spritzenfilter (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland) mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert.

Die im zuvor beschriebenen Arbeitsschritt zerkleinerten Markbestandteile wurden in ein 2 ml Reagenzgefäß (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland) mit dieser Enzymlösung pipettiert. Danach wurde die Suspension mehrmals durch auf und ab pipettieren resuspendiert und nachfolgend bei 850 U/min und 37°C im Thermomixer (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) über 90 Minuten lang enzymatisch verdaut. Alle 30 Minuten wurde das Reagenzgefäß kurz aus dem Thermomixer entnommen und die Markbestandteile mit Hilfe erneuter Resuspension zusätzlich mechanisch zerkleinert.

Nach Ablauf der 90 Minuten wurde die Zellsuspension 5 Minuten lang bei 26,5 x g zentrifugiert (Biofuge vito, Heraeus instruments, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland) und der Überstand aus Enzymlösung verworfen. Dieser und die weiteren Arbeitsschritte fanden an der Sicherheitswerkbank statt. Das Zellpellet am Boden des Reagenzgefäßes wurde mit 1 ml 37°C warmen sterilen PBS resuspendiert und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt und führte zu einer Reduktion der dünnen Schleifen, sodass am Ende 1 ml einer größtenteils aus IMCD-Zellen bestehenden Zellsuspension übrig blieb (37).

2.3.4 Beschichtung der Filter

Für die Kultivierung der IMCD-Zellen wurden Polycarbonat-Filter (*Costar Transwell Permeable Supports*, Corning Life Sciences, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) mit einer Fläche von 0,33 cm² und einer Porengröße von 0,4 µm in 24 well-Mikrotiterplatten (Sarsted AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Zur Verbesserung der Zelladhäsion an der Filteroberfläche wurde diese mit Kollagen IV (*mouse collagen IV*, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) beschichtet.

24 bis 48 h vor Gebrauch wurde das zuvor bei - 80 °C gelagerte und in einer Konzentration von 0,81 mg/ml 0,05 M HCL gelöste Kollagen IV bei 4 °C langsam aufgetaut und gelagert. Die gewünschte Kollagen IV-Dichte betrug 2 µg/cm² und das bevorzugte auf die Filteroberfläche zu pipettierende Benetzungsvolumen 50 µl. Hieraus ergab sich eine gewünschte Endkonzentration von 13,2 µg/ml. Zum Erreichen dieser Konzentration wurde die Kollagen-IV-Lösung mit 0,1 prozentiger Essigsäure verdünnt und zum Abschluss steril filtriert.

Die benetzten Filter wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Kollagen IV-Lösung wieder abpipettiert und die Filter zweimal mit je 200 µl steril filtriertem PBS gewaschen wurden. Bis zur Verwendung der Filter wurden die Mikrotiterplatten im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

2.3.5 Zellkulturmedium

Das zur Kultivierung verwendete Zellkulturmedium setzte sich aus DMEM mit hohem Glucoseanteil (*engl. Dulbecco's modified Eagles medium*, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) und einigen Zusätzen zusammen. 500 ml DMEM enthielten 5 ml einer Streptomycin-/Penicillinlösung (100 µg/ml; PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), 5 ml nicht essentielle Aminosäuren (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Germany) und 5 ml Ultrosor G (Pall GmbH, Dreieich, Deutschland), welches nach der zugehörigen Anleitung vorbereitet wurde. Die Zusätze waren steril oder wurden steril filtriert.

Die Osmolalität dieses Zellkulturmediums betrug etwa 320 mOsm/kg. Zur Kultivierung von IMCD-Zellen bei 600 mOsm/kg wurde die Osmolalität durch Zusatz von 100 mM NaCl und 100 mM Harnstoff erhöht.

2.3.6 Aussaat

Bevor die IMCD-Zellen ausgesät werden konnten, musste zunächst mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer Improved, Paul Marienfeld GmbH und Co. KG, Lauda-Königshofen,

Deutschland) ermittelt werden, wie viele Zellen in der Zellsuspension vorhanden waren. Es wurden als Standard 500.000 Zellen/cm² ausgesät.

Das hieraus ermittelte Volumen der Zellsuspension wurde an der Sicherheitswerkbank ins apikale Kompartiment auf die Filteroberfläche pipettiert. Anschließend erfolgte das Pipettieren von 600 µl des Zellkulturmediums in das basolaterale Kompartiment. Das apikale Kompartiment wurde mit Zellkulturmedium auf 300 µl aufgefüllt.

2.3.7 Kultivierung

Die Mikrotiterplatten mit den ausgesäten Zellen wurden im CO₂-Inkubator (Hera cell, Heraeus, Thermo Scientific, Waltham, USA) bei 37 °C und 8% CO₂ über 5 bis 6 Tage kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde unter der Sicherheitswerkbank täglich gewechselt. Über das Wochenende blieben die Mikrotiterplatten im CO₂-Inkubator unberührt.

2.3.8 Transepitheliale Widerstandsmessung

Zur Überwachung des Zellwachstums und der Konfluenz der Zellen auf der Filteroberfläche wurden immer direkt im Anschluss an den Wechsel des Zellkulturmediums Messungen des transepithelialen Widerstands durchgeführt (EVOM², WPI, Berlin Germany; Abbildung 9). Hierfür wurde die transepitheliale Spannung gemessen, die benötigt wurde, um einen festgesetzten Strom von 10 µA über die Filtermembran zu erreichen (31). Mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes konnte hieraus der Widerstand ermittelt werden.

Durch vorherige Beobachtung von IMCD-Zellkulturen galten 1000 Ohm als guter Richtwert für die Konfluenz der Zellen unter 300 mOsm/kg und Werte um 300 Ohm für die Konfluenz der Zellen unter 600 mOsm/kg. Abbildung 9 zeigt exemplarisch für die IMCD-Kultur bei 300 mOsm/kg die beschriebenen täglichen Widerstandsmessungen. Bei den Widerstandsmessungen zeigte sich bei allen Filtern ein zu Beginn langsamer Widerstandsanstieg mit zunehmend exponentiellem Verlauf und anschließender Stagnation. Unterschiedlich war der Zeitraum, in dem die Phasen abliefen. Einige Kulturen stagnierten in der Widerstandszunahme bereits am 5. Tag mit dramatisch abfallenden Widerständen am 6. Tag (Abbildung 9, rote Kurven). Der Widerstand dieser Kulturen war am 5. Tag deutlich höher als jener bei den Filtern ohne absinkende Widerstände am 6. Tag.

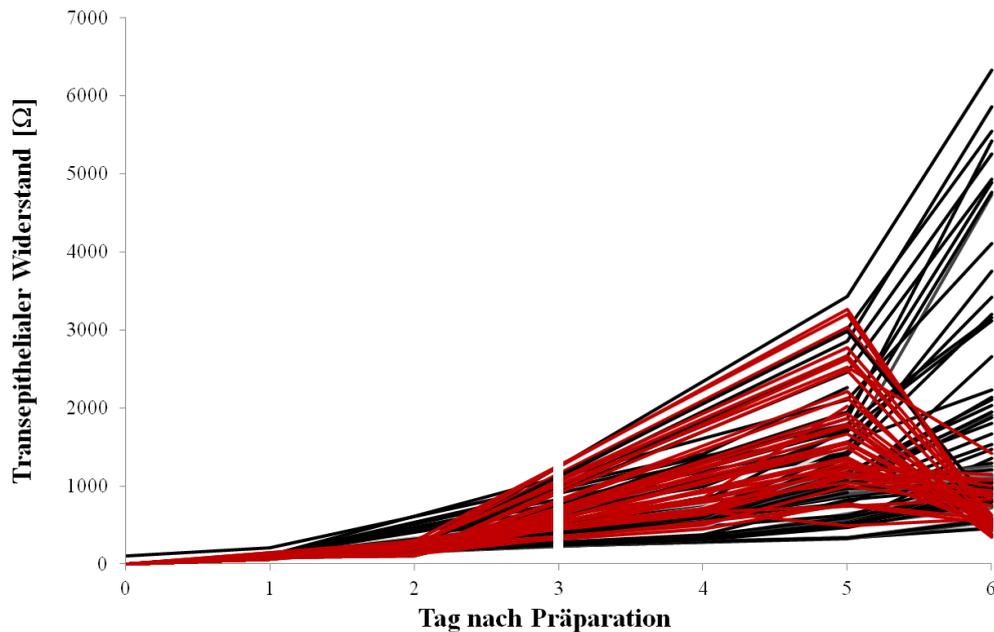


Abbildung 9: Widerstandsmessungen der 300 mOsm/kg-Kulturen

Die Abbildung zeigt den jeweiligen Widerstandsverlauf aller Filter. Filter mit absinkenden Widerständen sind rot markiert, die anderen schwarz. Der Leerwiderstand ist hier nicht von den Widerständen abgezogen worden. Er betrug ca. 60 bis 75 Ω. An Tag 3 wurde keine Messung durchgeführt (unterbrochene Linien).

Filter unter 300 mOsm/kg, deren Widerstände am Tag der Messung um mindestens 5% im Vergleich zum Vortag absanken, zeigten häufig Löcher und waren im Wuchsmuster unregelmäßig und mehrlagig (Abbildung 9, rote Linie). Diese Filter wurden nicht in die Auswertung der Ussing-Kammer-Messungen mit einbezogen. Filter unter 600 mOsm/kg zeigten keine absinkenden Widerstände am 6. Tag der Kultivierung.

2.3.9 Applikation von Hormonen

Zur Beobachtung eventueller Einflüsse von AVP oder Aldosteron auf die IMCD-Zellverbände wurden diese ca. 24 h vor der Durchführung weiterer Experimente appliziert.

Aldosteron wurde einzig unter 300 mOsm/kg -Kulturbedingungen näher untersucht. Hierfür wurde 1 µl einer $1,8 \times 10^{-6}$ M Aldosteron-Stocklösung in Ethanol in das basolaterale Kompartiment eines Filters pipettiert, sodass eine Konzentration von 300 nM erreicht wurde.

AVP wurde unter den beiden vorhandenen Kulturbedingungen ebenfalls basolateral appliziert. Die nach Pipettieren von 1 µl einer 6 µM AVP-Lösung in H₂O herrschende effektive AVP-Konzentration betrug 10 nM.

2.3.10 Applikation von Cyclosporin A

Um den Einfluss von Cyclosporin A auf Regulations- und Anpassungsvorgänge an verschiedene Osmolalitätszustände zu untersuchen, wurde unter den 600 mOsm/kg - Kulturbedingungen bei einigen Filtern ca. 24 h vor weiteren Messungen Cyclosporin A ins basolaterale Medium pipettiert. Hier wurden zwei verschiedene Endkonzentrationen untersucht. Zum einen 5 µg/ml (4,1 µM) und zum anderen 50 ng/ml (41 nM) Cyclosporin A. Hierfür wurden jeweils 0,3 µl einer entsprechend tausendfach höher konzentrierten Cyclosporin A-Lösung in Ethanol benötigt.

2.4 Ussing-Kammer-Messungen

2.4.1 Aufbau der Kammer

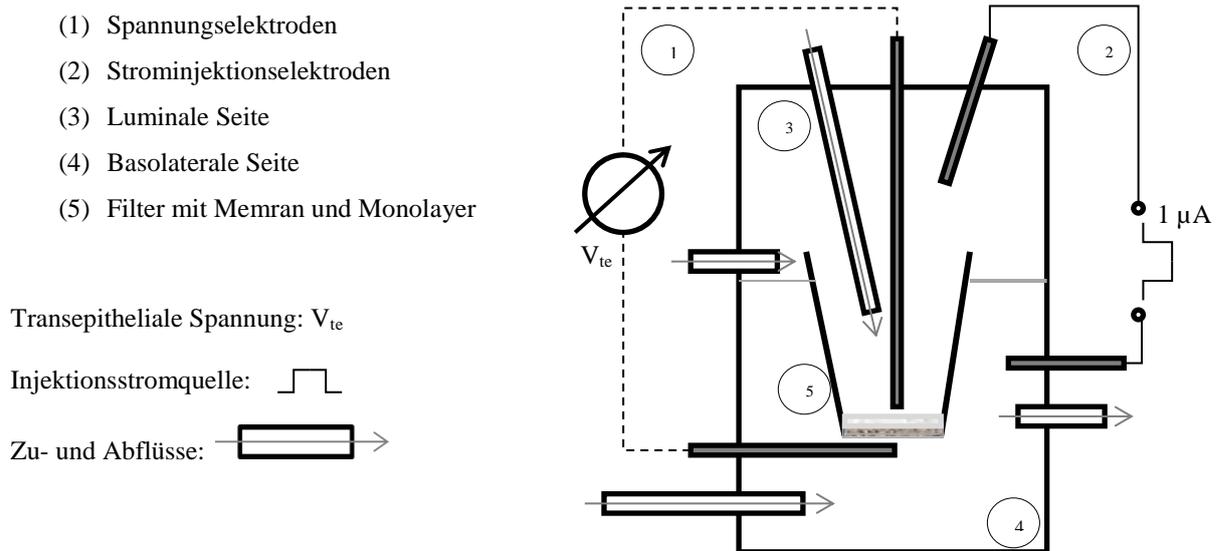
Die mit IMCD-Zellen bewachsenen Filter wurden in einer modifizierten Ussing-Kammer (EP Devices, Bertem, Belgien) untersucht (Abbildung 10). Die Ussing-Kammer bietet die Möglichkeit im Epithelverband gewachsene Zellen elektrophysiologisch näher zu charakterisieren. Sie besteht aus einer großen Kammer aus Plexiglas, in die die Filter der Primärzellkulturen eingesetzt werden können. Durch die Filtermembran sowie einen Dichtungsring wird die Kammer in zwei Hälften geteilt, ein apikales und ein basolaterales Kompartiment. Beide Kompartimente wurden durch eine Pumpe (ISM849, Ismatec, Wertheim, Deutschland), die verschiedene Lösungen mit einer Geschwindigkeit von 6,8 ml/min transportiert, über Tygon-Schläuche versorgt. Auf ihrem Weg durch die Schläuche wurden die Lösungen durch ein Heizsystem (Solution Heater SH-27b und Temperatur Controller TC-324b, Warner Instruments, Hamden, Connecticut, USA) auf eine Temperatur von 37 °C (in der Kammer) erwärmt. Über eine Spritzenbank (60 ml-Spritzen) mit Drei-Wege-Hähnen konnten unterschiedliche Lösungen in das apikale und auch in das basolaterale Kompartiment geleitet werden. Diese Spritzen befanden sich in einer Halterung etwa 40 cm über der Kammer. Dies entsprach etwas 4 kPa Perfusionsdruck. Gleichzeitig gab es für beide Kompartimente einen Abfluss, der einen kontinuierlichen Lösungsaustausch ermöglichte.

Sowohl im apikalen als auch im basolateralen Kompartiment befand sich eine Spannungselektrode (Abbildung 10, Nummer 1), die möglichst nah an der Filtermembran platziert wurde. Über dieses Elektrodenpaar wurde das transepitheliale Potential gemessen. Hierfür wurde die Spannung durch ein Voltmeter (UPG3, AD Elektronik, Buchenbach, Deutschland) gemessen und mit entsprechender Verstärkung durch ein Schreibgerät (BD11e, Kipp und Zonen B.V., Delft, Niederlande) mit einem Vorschub von 0,2 mm/s aufgezeichnet.

Zusätzlich befand sich jeweils eine sogenannte Strominjektionselektrode (Abbildung 10, Nummer 2) im apikalen und im basolateralen Kompartiment. Über einen Pulsgenerator (UPG3, AD Elektronik, Buchenbach, Deutschland, s.o.) wurde über die Strominjektionselektrode alle 5 s ein Strom von $1 \mu\text{A}$ für 1 s appliziert.

Alle Elektroden waren mit einem Dichtungsring gut nach außen abgedichtet. Die Spannungselektroden bestanden aus einer Agarbrücke (2,5% Agar in 1 M KCl), die über eine 1 M KCl-Lösung mit einem chlorierten Silberdraht in Verbindung stand. Die Agarbrücke wurde von den Lösungen im jeweiligen Kompartiment der Kammer umspült. Der Silberdraht wurde vor jeder Messung neu chloriert, ebenso wurden bei jeder Messung eine frische Agarbrücke und eine frische KCl-Lösung verwendet. Die Stromelektroden bestanden ebenfalls aus einem chlorierten Silberdraht. Dieser wurde lediglich bei Abnutzung neu chloriert.

Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Ussing-Kammer



2.4.2 Versuchsdurchführung

Vor und nach jeder Messung wurde ein beschichtetes Leerfilter, auf dem keine Zellen gewachsen waren, in die Kammer gesetzt, die Pumpe angestellt und die Kammer auf beiden Seiten mit Kontrolllösung gefüllt, um die Stabilität der Messung bzw. der Elektroden zu prüfen. Akzeptiert wurde ein um $\pm 1 \text{ mV}$ (max. 3 mV) stabiler Null-Wert.

Nach Messung des Leerwerts wurde mit den Messungen der Filter aus der Primärzellkultur begonnen (Abbildung 11). Zum Wechsel der Filter wurde die Pumpe kurz gestoppt. Nach der Stabilisierung des transepithelialen Potentials wurde mit dem eigentlichen Versuch begonnen.

Zunächst wurde apikal 50 μM Amilorid zugeführt, um eventuelle transepitheliale Transportvorgänge zu hemmen. War das transepitheliale Potential im Anschluss stabil, wurde ebenfalls im apikalen Kompartiment auf Niedrig-NaCl-Lösung mit Amilorid gewechselt. Es entstand ein Diffusionspotential (Abbildung 11, Pfeil). Der Messpunkt war der Punkt, bei dem die Pulsänderung schneller als die Änderung des Diffusionspotentials war. Nach ca. 150 Sekunden wurde wieder auf die mit Amilorid versetzte Kontrolllösung gewechselt und nach erneuter Stabilisierung des Potentials auf die Niedrig-NaCl-Lösung basolateral gewechselt. Hier zeigte sich eine langsamere Änderung des Potentials. Nach etwa 150 Sekunden wurde wieder zur Kontrolllösung gewechselt. Als letzter Schritt wurde die Hemmung der epithelialen Natriumkanäle wieder aufgehoben und dafür nach weiteren etwa 150 Sekunden auch apikal wieder auf die nicht mit Amilorid versetzte Kontrolllösung gewechselt.

Im Anschluss wurden die Zellen auf den Filtermembranen für Immunfluoreszenzfärbungen fixiert.

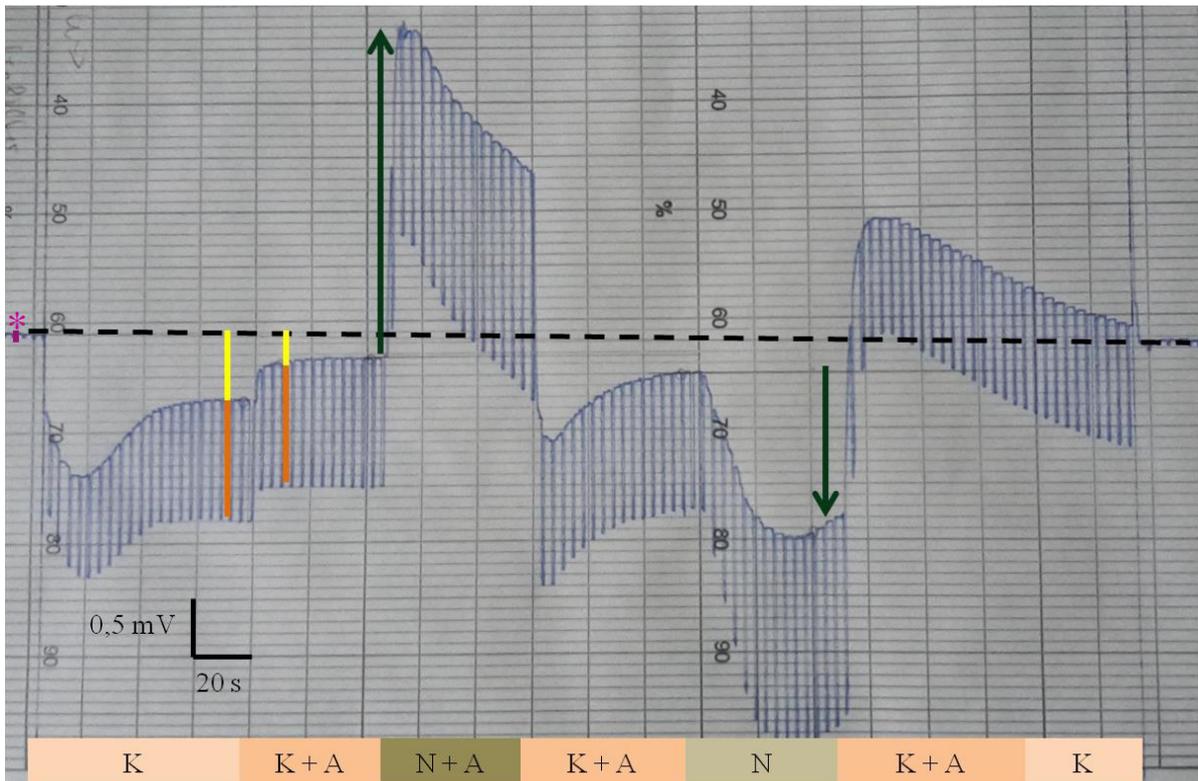


Abbildung 11: Auswertung der Ussing-Kammer-Aufzeichnung

- K** : Kontrolllösung luminal und basolateral
- K+A** : Kontrolllösung und Amilorid luminal, Kontrolllösung basolateral
- N+A** : Niedrig-NaCl-Lösung und Amilorid luminal, Kontrolllösung basolateral
- N** : Niedrig-NaCl-Lösung basolateral, Kontrolllösung und Amilorid luminal
- : Ausmessung V_{te}
- : Ausmessung ΔV_{te}
- -** : Systemnull
- *** : Wert zur Leerwiderstandsberechnung (mit * gekennzeichnet)
- : Diffusionspotential

2.4.3 Auswertung

Zunächst wurde auf dem Schreiberpapier über die Leerfiltermessung vor und nach der Durchführung des Versuchs eine Verbindungslinie als eigentliche 0 mV-Linie gezogen (Abbildung 11, schwarze gestrichelte Linie). Ausgehend von dieser Linie konnte das transepitheliale Potential V_{te} (Abbildung 11, gelbe Linie), sowie die Spannungsänderung ΔV_{te} (Abbildung 11, orange Linie) bei Applikation des Stroms I von $-1 \mu\text{A}$ gemessen werden. Die

Spannung wurde auf der luminalen Seite gemessen und auf die basolaterale Seite bezogen. Mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes und der Filtermembranfläche A von $0,33 \text{ cm}^2$ wurde der flächenbezogene transepitheliale Widerstand R_{te} bestimmt:

$$R_{te} = \frac{\Delta V_{te}}{I} \times A - R_{LF} \quad (1)$$

R_{LF} gibt den flächenbezogenen Widerstand des Leerfilters an, der vom gesamten gemessenen Widerstand abgezogen werden musste. R_{LF} wurde als Mittelwert aller zwischen den einzelnen Experimenten gemessenen Leerwiderstände berechnet:

$$R_{LF} = \frac{\Delta V_{te}}{I} \times A \quad (2)$$

Aus dem aufgezeichneten transepithelialen Potential und dem berechneten transepithelialen Widerstand konnte der sogenannte äquivalente Kurzschlussstrom I'_{sc} (*engl.: equivalent short-circuit current*) berechnet werden. Dies entspricht rechnerisch dem Strom (eigentlicher Kurzschlussstrom), der hätte appliziert werden müssen, damit ein transepitheliales Potential von 0 mV entstanden wäre und somit keine parazellulären Transportvorgänge stattgefunden hätten (62).

Diese Berechnung erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes:

$$I'_{sc} = \frac{V_{te}}{R_{te}} \quad (3)$$

Der durch Amilorid gehemmte Transportstrom $\Delta I'_{sc \text{ amil}}$ wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta I'_{sc \text{ amil}} = I'_{sc K} - I'_{sc K+A} \quad (4)$$

$I'_{sc K}$ ist hierbei der epitheliale Transport vor der Hemmung und $I'_{sc K+A}$ der epitheliale Transport nach dem Vorhandensein von Amilorid in der apikalen Kontrolllösung.

Für die Auswertung des Diffusionspotentials in mV wurde die Abweichung des transepithelialen Potentials direkt nach dem Lösungswechsel auf Niedrig-NaCl gemessen (Abbildung 11, grüner Pfeil). V_{te} , R_{te} und I'_{sc} wurden unter Kontrollbedingungen nach Amilorid-Applikation und zwischen den Messungen des Diffusionspotentials bestimmt.

Das Diffusionspotential wurde um das Liquid-Junction Potential LJP korrigiert. Dieses entsteht an den Grenzflächen zwischen unterschiedlich zusammengesetzten Salzlösungen. In diesem Fall zwischen 1 M KCl in den Agarbrücken und den verschiedenen Experimentierlösungen. Das LJP wurde unter Verwendung der Henderson-Gleichung (7) und unter Berücksichtigung der Ionenmobilitäten berechnet (8, 77, 112).

Anschließend wurde das LJP vom Diffusionpotential (DP) abgezogen:

$$DP_{correct} = DP - LJP \quad (5)$$

Das LJP bei luminalem Lösungswechsel betrug nach Durchführung der oben beschriebenen Rechnung 1,79 mV bei 300 mOsm/kg -Bedingungen und 2,13 mV bei 600 mOsm/kg-Bedingungen.

Für die Berechnung der Permeabilität des Epithels für Natriumionen und Chloridionen (P_{Na^+/Cl^-}) wurde eine Abwandlung der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung verwendet (39):

$$DP_{correct} = \frac{R \times T}{F} \times \ln \left(\frac{P_{Na^+} \times [Na^+]_{bl} + P_{K^+} \times [K^+]_{bl} + P_{Cl^-} \times [Cl^-]_{lu}}{P_{Na^+} \times [Na^+]_{lu} + P_{K^+} \times [K^+]_{lu} + P_{Cl^-} \times [Cl^-]_{bl}} \right) \quad (6)$$

Legende: R = 8,31451 J/mol × K; T = 310 K; F = 96485,3 C/mol; basolateral (bl); luminal (lu); DP_{correct} [mV]

Berücksichtigt man nur die Permeabilitäten für die Natrium- und Chloridionen, kann durch Umformung folgende Gleichung für das Verhältnis P_{Na^+/Cl^-} gewonnen werden:

$$\frac{P_{Na^+}}{P_{Cl^-}} = \frac{[Cl^-]_{bl} - e^{-\frac{DP_{correct} \times F}{R \times T}} \times [Cl^-]_{lu}}{[Na^+]_{lu} - e^{-\frac{DP_{correct} \times F}{R \times T}} \times [Na^+]_{bl}} \quad (7)$$

Legende: R = 8,31451 J/mol × K; T = 310 K; F = 96485,3 C/mol; basolateral (bl); luminal (lu)

Die Permeabilität der Natriumionen wurde über Anwendung der Kimizuka-Koketsu-Gleichung berechnet (56, 82):

$$P_{Na^+} = \frac{G \times \frac{R \times T}{F^2}}{a \times \left(1 + \frac{P_{Na^+}}{P_{Cl^-}}\right)} \times 10^{-6} \quad [10^{-3} cm/s] \quad (8)$$

Legende: R = 8,31451 J/mol × K; T = 310 K; F = 96485,3 C/mol; basolateral (bl); luminal (lu)

Bei der Variablen G handelt es sich hierbei um die Leitfähigkeit, die dem Kehrwert des transepithelialen Widerstands bei Verwendung der Kontrolllösung beidseits entspricht, und bei a handelt es sich um die Ionenaktivität von Na⁺. Diese wird wie folgt berechnet:

$$a = \gamma \times c \quad (9)$$

Bei c handelt es sich um die Konzentration in mol/l und γ ist der Aktivitätskoeffizient für Na⁺. Der Aktivitätskoeffizient ergab sich aus folgender Gleichung:

$$\log \gamma = \frac{0,5 \times Z^2 \times \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \quad (10)$$

Z ist die Ladung und I die Ionenstärke der jeweiligen Experimentallösung:

$$I = \frac{1}{2} \times \sum c_i \times Z_i^2 \quad (11)$$

Die Permeabilität für die Chloridionen konnte ebenfalls mit Hilfe der vorherigen Formeln berechnet werden:

$$P_{Cl^-} = P_{Na^+} \times \frac{1}{\frac{P_{Na^+}}{P_{Cl^-}}} \quad (12)$$

Nach der Auswertung des Diffusionspotentials und der Permeabilitäten bei luminalem Lösungswechsel wurden die gleichen Berechnungen bei basolateralem Lösungswechsel durchgeführt. Die Reaktion der Zellen auf den basolateralen Wechsel fand unter anderem auf Grund der Kollagenbeschichtung langsamer statt als beim luminalen Wechsel. Es wurde eine Reaktionszeit von 100 Sekunden angenommen, weshalb das Diffusionspotential konstant nach dieser Zeit gemessen wurde (Abbildung 11, 2. grüner Pfeil).

Die Auswertung der basolateralen Seite wurde zwar durchgeführt, wird im Ergebnisteil aber nicht näher aufgeführt, da durch die Kollagenbeschichtung kein direkter Kontakt der IMCD-Zellen zur jeweiligen Lösung hergestellt wurde und auf Grund der größeren basolateralen Kammer kein schneller Lösungswechsel möglich war. Es kam deshalb nur zu einem langsamen Aufbau des DP, bei dem eine gleichzeitig einsetzende Gegenregulation der Zellen nicht ausgeschlossen werden konnte. Auf Grund dieser Problematik in der Messtechnik wurden die Ergebnisse des basolateralen Wechsels nicht quantitativ berücksichtigt.

2.4.4 Fixierung

Abschließend wurden die Filter erneut in eine 24-well Mikrotiterplatte eingesetzt und luminal sowie basolateral mit insgesamt 1 ml einer 0,4% PFA-Lösung in PBS für 4 °C über Nacht inkubiert. Die PFA-Lösung wurde dann durch PBS ersetzt und die Filter bis zur Anfärbung (max. 2 Tage) bei 4 °C aufbewahrt.

2.5 Protokoll zur *in vivo*-Modulation des Wasserhaushalts

2.5.1 Versuchstiere

42 Sprague-Dawley-Ratten beiderlei Geschlechts, die zwischen 4 und 6 Wochen alt waren, wurden in drei Gruppen á 14 Tiere für 3 Tage auf einem metabolischen Käfig (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland) mit Gelnahrung (Tabelle 7 und Abbildung 12) gefüttert. Die drei verschiedenen Versuchsgruppen waren: Kontrollgruppe, Furosemidgruppe und die Wasserbelastungsgruppe.



Abbildung 12: Metabolische Käfige

Die Abbildung zeigt die Versuchstiere der drei verschiedenen Versuchsgruppen während der Behandlung im metabolischen Käfig. Links eine Ratte aus der Kontrollgruppe, in der Mitte eine Ratte der Furosemidgruppe (im Futtergang) und rechts eine Ratte aus der Wasserbelastungsgruppe. Gut zu sehen ist die unterschiedliche Urinproduktion in den drei Versuchsgruppen.

Tabelle 7: Gelfutterzusammensetzung für eine 100 g schwere Ratte

Kontrollgruppe	Furosemidgruppe	Wasserbelastungsgruppe
<ul style="list-style-type: none"> • 14 g pulverisiertes Futter (R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) • 20 ml Wasser • 0,2 g Agar 	<ul style="list-style-type: none"> • 14 g pulverisiertes Futter (ssniff R/M-H) • 20 ml Wasser • 0,2 g Agar • 0,005 g Furosemid <p>Trinkwasser mit 10 mmol KCl und 140 mmol NaCl/Liter</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 14 g pulverisiertes Futter (ssniff R/M-H) • 60 ml Wasser • 0,6 g Agar

Die Kontrollgruppe bekam eine niedrig normale Wassermenge pro Tag, die Wasserbelastungsgruppe eine dreifach höhere. Die Furosemidgruppe erhielt 0,015 g Furosemid pro 100 g einer Futter-/ Wassermenge, deren Wassergehalt mit der Kontrollgruppe identisch war. Um den Elektrolythaushalt unter Gabe des Schleifendiuretikums nicht entgleisen zu lassen und nur die Konzentrierungsfähigkeit der Niere zu beeinflussen, hatten die Ratten der Furosemidgruppe freien Zugang zu Trinkwasser, das mit KCl und NaCl versetzt war.

2.5.2 Metabolische Daten

2.5.2.1 Ein- und Ausfuhr

Die Einfuhr von Futter und Wasser wurde täglich auf das Gewicht der Ratte abgestimmt. Dafür wurde morgens als erstes die Ratte gewogen (Sartorius 3707, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Das Gesamtgewicht des Futters m_F für eine 100 g Ratte betrug für die Kontrollgruppe und für die Furosemidgruppe 34,2 g, für die Wasserbelastungsgruppe 74,6 g. Über dieses Gewicht und das Gewicht der Ratte m_R wurde die Futtermenge m_{24h} für die nächsten 24h bestimmt:

$$m_{24h} = \frac{m_F \times m_R}{100g} \quad (13)$$

Bei der Furosemidgruppe wurde die zusätzlich pro Tag aufgenommene Salzwassermenge bestimmt und zu der Wasseraufnahme über das Futter addiert.

Für die Ausfuhr wurden die Messbehältnisse zum Auffangen des Urins und Kots vor dem Einsetzen der Ratte in den Käfig gewogen, um anschließend über die Zunahme des Gewichts der Behältnisse die Ausfuhr zu bestimmen.

2.5.2.2 Urinosmolalität

Nach 24 und 48 h wurde eine 1600 μ l Probe des jeweiligen 24h-Urins entnommen. Nach 72 h wurde der Urin gesammelt und diesem zusätzlich der Urin aus der Blase der Ratte nach Präparation hinzugefügt. Diesem Sammelurin wurde dann ebenfalls eine 1600 μ l Probe entnommen. Die Urinproben wurden mit einer Minizentrifuge (Erich Eydam KG, Kiel, Deutschland) 2 Minuten lang bei 2200 x g zentrifugiert, um die nicht löslichen Teilchen aus dem Urin zu entfernen. Im Überstand wurde mit Hilfe eines Osmometers (*cryoscopic osmometer*, Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin, Deutschland) eine Doppelbestimmung der Osmolalität in mOsm/kg durchgeführt. Am Osmometer fand zuvor eine Zweipunkteichung für 0 mOsm/kg (deionisiertes H₂O) und für 850 mOsm/kg statt.

2.5.2.3 Kottrockengewicht

Nach 72 h auf dem metabolischen Käfig wurden von dem Kot der letzten 24 h ca. drei bis fünf Kotkugeln in ein 2 ml leer gewogenes Reagenzgefäß überführt und direkt im Anschluss

gewogen (AE 163, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland). Das Reagenzgefäß wurde unverschlossen an der freien Luft gelagert und in regelmäßigen Abständen erneut gewogen. Das Gewicht wurde, bis es sich nicht weiter veränderte, notiert. Aus dem so erhaltenen Feucht- und Trockengewicht wurde der Wassergehalt des Kots berechnet.

2.5.3 Nierenpräparation

2.5.3.1 Durchführung

Nachdem die Tiere ca. 72 h im metabolischen Käfig unter ihrer jeweiligen Diät verbracht haben, wurden die Nieren mit einem speziellen Operationsverfahren entnommen und für die Tubulusdissektion vorbereitet.

Eine Spritze mit Enzymlösung zur Andauung des Bindegewebes wurde bereits rechtzeitig vor der Operation vorbereitet. Die Enzymlösung bestand aus 0,5 mg Kollagenase II und 1 ml der Inkubationslösung. Über einen Adapter war die Spritze mit einem Polyethylenschlauch (0,4 mm (25 M), Erich Eydam KG, Kiel, Deutschland) verbunden, dessen längerer Verlauf durch Erwärmen auf einen Durchmesser entsprechend der Nierenarterie geformt worden war. Spritze und Katheter waren frei von Luftblasen. Das Ende des Katheters war schräg mit einem Skalpell angeschnitten worden, um das Einführen in die Nierenarterie zu erleichtern.

Zunächst wurde die Ratte in einer Narkosebox mit 5 Vol.-% Isofluran narkotisiert. Im Anschluss wurde sie auf die Operationsfläche gelegt, aus einer mit Alufolie umwickelten Korkplatte bestand. Die Narkose wurde per Inhalationsmaske, bestehend aus 2 ineinandergeschobenen Spritzen, aufrechterhalten. Die Korkplatte diente zur besseren Fixierung von Hakenhaltern und Kanülen zum Weghalten der Organe bei der Präparation.

Zunächst wurde durch Kompression des Schwanzes mit einer Pinzette die Schmerzwahrnehmung des Tieres geprüft. Zeigte sich keine Reaktion, wurde mit der Operation begonnen und die Narkose vorsichtig auf 3,7 Vol.-% gesenkt.

Zu Beginn der Operation wurde der Bauch mit Öl (Paraffinöl, Walter-CMP GmbH und Co. KG, Kiel, Deutschland) eingepinselt, um Fellhaare im späteren Operationsbereich zu vermeiden. Das Tier lag in Rückenlage bis Linksseitenlage. Es wurde ein Flankenschnitt links durchgeführt und die Leber, Milz sowie Darm mit Hakenhaltern aus gebogenem Stahldraht sowie Klemmen und Kanülen (22 G 1 ¼, Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland) aus dem Operationsgebiet entfernt.

Die Niere selbst wurde mit einer Klemme, die über eine Kanüle in Position gehalten wurde, an ihrer Fettkapsel in eine gerade Position gebracht. Die anschließende Präparation fand unter

einem Mikroskop statt (WILD M3, Typ 355110, Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz). Mit zwei Pinzetten wurde die Nierenarterie freigelegt und von umgebendem Gewebe befreit. Es wurde insbesondere auf Verzweigungen geachtet. War die Nierenarterie soweit freigelegt, wurde ein dünner schwarzer Faden (Schlüsselgarn, Ackermann-Göggingen AG, Augsburg, Deutschland) unter Zuhilfenahme der Pinzetten um die Arterie gelegt. Die beiden Enden wurden mit einer Klemme festgehalten und wiederum mit einer Kanüle wurde diese Konstruktion auf Zug fixiert und die Blutzufuhr zur Niere unterbunden.

Die Operation fand zu zweit statt. Während der Unterbindung der Blutzufuhr wurde die vorgeheizte 1 ml Spritze (Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland) einer Spritzenheizung entnommen, die Nierenarterie eingeschnitten und der Katheter angereicht. Mit den Pinzetten wurde der Katheter in die Niere geführt und festgehalten. Die Enzymlösung konnte nun durch die Assistenz gespritzt werden. Auf Grund des eventuell großen Drucks wurde der Adapter zwischen Spritze und Katheter hierbei extra festgehalten. Zunächst wurde die eine Hälfte der Enzymlösung gespritzt und abgewartet, ob die Lösung die gesamte Niere erreicht. Dies war am Ausbleichen der Niere erkennbar. Blieb ein Teil der Niere nicht perfundiert, so wurde versucht, durch Veränderung der Lage des Katheters einen anderen Zweig der Nierenarterie zu erreichen und der Rest der Enzymlösung gespritzt. Der Vorgang zwischen Unterbindung der Blutzufuhr und Spritzen der Enzymlösung wurde möglichst kurz gehalten. Im Anschluss wurden Nierenarterie und -vene durchtrennt und die Niere entnommen. Der Blutverlust war hier bereits für den Tod der Ratte verantwortlich (Prozedere insgesamt unter 5 Minuten). Zusätzlich wurde vor dem Abstellen der Narkose der Thorax eröffnet.

Zur Bestimmung der Urinosmolalität wurde zuletzt der Blasenurin mit einer 1 ml Spritze und einer Kanüle (27 G $\frac{3}{4}$, Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland) entnommen.

Die mit Enzymlösung perfundierte Niere wurde in einer Petrischalenunterhälfte (35 × 10 mm, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland) mit Inkubationslösung zu einem zweiten Arbeitsplatz transportiert und mit Pinzetten von ihrer Kapsel befreit. Anschließend wurde sie mit einer Rasiermesser Klinge in dünne Scheiben geschnitten, die wiederum in eine Petrischalenunterhälfte mit Inkubationslösung überführt wurden. Diese wurde auf Eis gelegt und die Nierenscheiben standen zur Dissektion zu Verfügung.

2.5.4 Tubulusdissektion

2.5.4.1 Durchführung

Von den in der Inkubationslösung liegenden Nierenschnitten wurde vor der Dissektion zunächst eine der dünnen Nierenscheibchen mit einer Pinzette in eine Petrischalenoberhälfte mit Sortierlösung überführt. Diese Petrischalenoberhälfte wurde unter ein Mikroskop (Leica MZ 16, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) gestellt. Die Dissektionsfläche wurde auf 4°C gekühlt (von Wasser durchflossener Glassandwich, Kühlgerät: Haake F3, Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland), um das Gewebe möglichst lange vital zu halten. Mit zwei Pinzetten wurde unter einem Mikroskop ein Teil des Kortex, ein Teil des äußeren Marks und ein Teil des inneren Marks präpariert. Diese Gewebstücke wurden in jeweils einem 1,5 ml Reagenzgefäß zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C für eventuelle spätere Zwecke gelagert.

Die Dissektion fand ebenfalls unter diesem Mikroskop statt. Mit zwei Pinzetten (Manufactures D'Outils Dumont SA, Montignez, Schweiz) wurden im inneren Mark Sammelrohre bzw. dünne ab- und aufsteigende Schleifen präpariert. Um intakte Tubuli zu erhalten, wurden sie durch Spreizen des umliegenden Gewebes und vorsichtiges Freipräparieren, möglichst ohne dabei selbst in Kontakt mit den Pinzetten zu kommen, freigelegt. Die Tubuli wurden für das entsprechende Experiment mit Hilfe einer Transferpipette in das Bad des Perfusionsarbeitsplatzes überführt.

2.5.4.2 Dissektionskriterien

2.5.4.2.1 Sammelrohre

Für die Experimente wurden lediglich Sammelrohre des inneren Marks verwendet. Die Dissektion wurde ab dem Zeitpunkt der Entnahme der Niere über einen Zeitraum von etwa 3 h durchgeführt. Dieses Zeitfenster ergab sich aus einer Reihe an Vorversuchen, die zeigten, dass die Tubuli nach 3 h sowohl unter dem Mikroskop durchscheinend wirkten und andererseits einen Widerstandsverlust zeigten. Die Sammelrohre waren anhand ihres charakteristischen Aussehens eindeutig zu identifizieren.

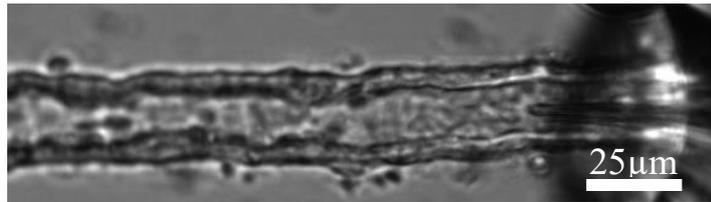


Abbildung 13: Perfundiertes Sammelrohr

Perfundiertes Sammelrohr: Gut zu erkennen sind das weite Lumen und der hohe Zytoplasmaanteil, der insgesamt zu einem größeren Durchmesser der Sammelrohre im Vergleich zu dünnen Schleifen führt.

2.5.4.2.2 Dünne Schleifen

Auch für die Experimente an den dünnen Schleifen wurden nur jene aus dem inneren Nierenmark verwendet. Da die aufsteigenden dünnen Schleifen lediglich im inneren Mark vorkommen, musste dieses Kriterium nur bei Präparation der absteigenden dünnen Schleifen berücksichtigt werden. Bei diesen Experimenten zeigte sich, dass ein Dissektionszeitfenster von 2 h nicht überschritten werden sollte. Die dünnen Schleifen zeigten danach ein schlechtes strukturelles Aussehen und einen Widerstandsverlust.

Für die Experimente war die Unterscheidung in ab- und aufsteigende dünne Schleife entscheidend. Es gab zwei charakteristische Morphologien (Abbildung 14): Bei der dTL waren die Zellkerne rundlich prominent und saßen sich fast sägezahnartig gegenüber, sodass das Lumen ein schlangenförmiges Aussehen bekam. Bei der aTL saßen die Zellkerne zumeist weiter auseinander, waren weniger prominent und das Lumen eher schlauchförmig. Zudem hingen an den aTL häufiger Überreste der Vasa recta. Durch Betrachtung des Übergangs der aufsteigenden dünnen in die aufsteigende dicke Schleife konnten die dünnen Schleifen mit den weiter auseinander liegenden Zellkernen als aufsteigende dünne Schleifen identifiziert werden. In der Literatur sind diese Charakteristika ebenso beschrieben (79).

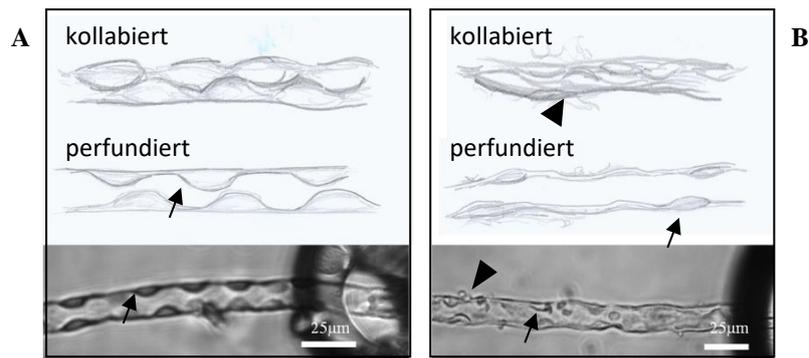


Abbildung 14: Dünne Schleifen

A) absteigende dünne Schleife (Skizzen + Kamerabild während Perfusion): zu erkennen an dem zopfartigen Aussehen im kollabierten Zustand und den luminal vorbuckelnden Zellkernen (↗) sowie dem geschlängelten Lumen im perfundierten Zustand.

B) aufsteigende dünne Schleife (Skizzen + Kamerabild während Perfusion): zu erkennen an den ungleichmäßig verteilten, weniger vorbuckelnden Zellkernen (↗) und Resten der Vasa recta (▲)

(Skizzen: Dr. Nina Himmerkus)

Die Vasa recta, die ebenfalls bei der Dissektion zu finden waren, waren meist ein wenig kleiner und ließen Erythrozyten im Lumen erkennen. Des Weiteren hatten sie keinen messbaren Widerstand im Perfusionssystem und konnten somit auch eindeutig von den dünnen Schleifen abgegrenzt werden.

2.5.5 Tubulusperfusion

2.5.5.1 Aufbau

Für die Tubulusperfusion wurde eine komplexe Apparation verwendet. Kernstück war ein inverses Mikroskop (Axiovert 10, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit Kamera (RT SE, SPOT, Sterling Heights, MI, USA) und entsprechender Software (SPOT Imaging Microscopy Imaging Software, Spot Imaging, Sterling Heights, MI, USA), um die Vorgänge der Perfusion zu beobachten und einzelne Bilder der Tubuli zu machen. Die Tubuli wurden in ein Bad auf dem Mikroskoptisch überführt, in dem über einen Zu- und einen Abfluss ein ständiger Fluss erzeugt werden konnte. Der Zufluss war über mehrere Hähne mit zwei 60 ml-Spritzen und mit zwei 20 ml-Spritzen verbunden, die so einzeln als Reservoir für die zufließende Lösung ausgewählt werden konnten und zwischen denen beliebig hin und her gewechselt werden konnte. Die Lösungen durchflossen einen beheizten Wassermantelschlauch (Heizgerät, F 25, JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland). Der Mikroskoptisch wurde

ebenfalls beheizt (Eigenbau Physiologisches Institut) und so die Experimente bei 37 °C durchgeführt.

Die einzelnen Tubuli wurden in das eigentliche Perfusionssystem eingespannt, nachdem sie in das Bad mit Hilfe einer Transferpipette überführt worden waren. Dieses Perfusionssystem wurde vor Beginn einer Versuchsreihe an einer eigenen Glas-Mikroschmiede (Eigenbau MPI Biophysik, Frankfurt) hergestellt und bestand von innen nach außen aus insgesamt vier Pipetten (Abbildung 15): der Flüssigkeits-Austausch-Pipette, der Perfusionspipette, der Konstriktionspipette und der Sylgardpipette. Die drei letztgenannten Pipetten waren in einzelnen Halterungen befestigt und die Perfusionspipette und die Sylgardpipette ließen sich einzeln vor und zurück fahren. Die Sylgardpipette wurde bei den durchgeführten Experimenten zurückgefahren und diente nur zum Schutz der inneren Pipetten. Die Konstriktionspipette war über ein Schlauchsystem mit einer 20 ml Glasspritze (Fortuna Optima, Poulten und Graf GmbH, Wertheim, Deutschland) verbunden über die ein Unter- bzw. Überdruck hergestellt werden konnte. Der Innendurchmesser der Konstriktionspipette betrug bei der Sammelrohrperfusion zwischen 20 und 22 μm und bei der Perfusion der dünnen Schleifen zwischen 15 und 16 μm . Über weitere Manipulatoren, auf denen die Grundhalterung der vier Pipetten angebracht war, konnte das ganze Perfusionssystem feinreguliert bewegt werden. Mit Hilfe dieser Feinregulation und des Unterdrucks, wurde der transferierte Tubulus mit der Konstriktionspipette eingefangen und für das Vorfahren der Perfusionspipette in den Tubulus in Position gehalten. Anschließend wurde das andere Ende des Tubulus mit Hilfe einer einzelnen Haltepipette fixiert. Diese wurde ähnlich der anderen drei Pipetten hergestellt und konnte nach Anbringen in einer Halterung ebenfalls über Manipulatoren gesteuert werden.

Zur weiteren Versuchsdurchführung wurde der Zufluss zum Bad geöffnet, um einen kontinuierlichen Lösungswechsel zu erhalten. Die Perfusionspipette war doppelläufig (*engl. double-barreled*), wodurch zwei Perfusionsmöglichkeiten vorhanden waren. Im „Kanal 1“ lief die Flüssigkeits-Austausch-Pipette bis zur Spitze der Perfusionspipette und im „Kanal 2“ ein kleiner Polyethylen-Schlauch. Über zwei Abflusswege lief die Flüssigkeit wieder aus dem Perfusionssystem. Diese Wege waren über Hamilton-Hähne zu regulieren und hatten Verbindung zu einem Druckregulator, über den ein Druck zwischen 50 und 1000 cmH_2O angelegt werden konnte, um einen automatischen konstanten luminalen Fluss zu erhalten.

Zur Messung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Tubuli befand sich sowohl im Bad eine Agarbrücke, die über eine 1 M KCl-Lösung mit einer Silberchloridelektrode verbunden war, als auch auf der luminalen Seite an der Perfusionspipette. Über diese zwei Elektroden konnte die Spannung sowie die Spannungsänderung über die Membran der Tubuli während des

Experiments gemessen werden. Ein Silberdraht im „Kanal 2“ war mit einer Stromquelle verbunden, die in regelmäßigem Abstand (etwa alle 5s) einen 13 nA Strompuls für 1s abgab und wie bereits für die Ussing-Kammer-Messungen erwähnt (siehe Kapitel 2.4.1) zu einer Spannungsänderung (ΔV_{te}) führte. Die Parameter wurden über einen angeschlossenen Schreiber (Flachbettschreiber, Kipp und Zonen B.V., Delft, Niederlande) mit einem Vorschub von 0,2 mm/s aufgezeichnet. Über die erhaltenen Messwerte konnten nun der transepitheliale Widerstand und weitere in der nachfolgenden Versuchsdurchführung untersuchte Parameter berechnet werden.

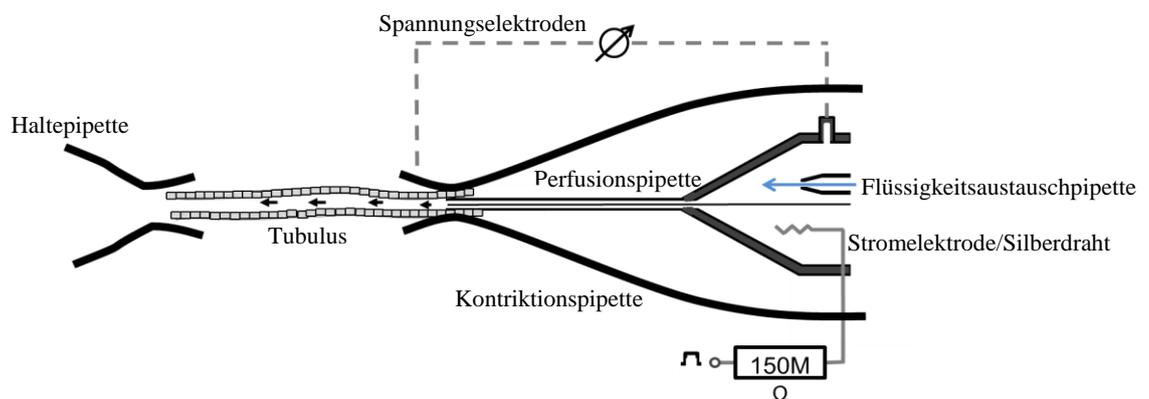


Abbildung 15: Aufbau des Perfusionsystems

Die Sylgardpipette ist nicht eingezeichnet.

2.5.5.2 Versuchsdurchführung

Nach Einspannen des Tubulus in das Perfusionsystem wurde der Zufluss zum Bad geöffnet. Zu diesem Zeitpunkt befand sich eine Kontrollösung von 600 mOsm/kg H₂O im Bad und im basolateralen Zufluss sowie luminal in der Perfusionpipette und deren Zufluss.

Sobald Spannung und Spannungsänderung stabil waren, wurde zunächst der Widerstand ΔV_{te} auf Grund von Erfahrungswerten abgeschätzt. Befand sich dieser in einem geschätzten Bereich unter $1 \Omega \times \text{cm}^2$, so wurde der Tubulus nicht für ein Experiment verwendet und verworfen. Zumeist waren Löcher sichtbar oder der Originalentnahme zeitlich zu weit zurückliegend.

Wurde der Widerstand als angemessen eingeschätzt ($> 1 \Omega \times \text{cm}^2$), begann das Experiment.

Zunächst wurde basolateral ein Austausch der Kontrolllösung gegen eine Niedrig-NaCl-Lösung von gleicher Osmolalität durchgeführt und im Anschluss wurde wieder auf die Kontrolllösung gewechselt. Jeder Lösungswechsel wurde auf dem Schreiberpapier gekennzeichnet und nach jedem Experiment wurden der Leerwert sowie die Null des Systems kontrolliert, die beim

Ablezen der Spannungsänderung und der Spannung eine Rolle spielen. Nach jedem vollendeten Lösungswechsel wurden die Perfusion und die Morphologie fotodokumentiert.

2.5.5.3 Analyse

Für die Auswertung wurden die Aufzeichnungen auf dem Schreiberpapier, die Bilder der Tubuli während der unterschiedlichen Perfusionsphasen und das Programm Image J benötigt. Mit Hilfe dieses Programmes war es möglich, die Länge der Tubuli und ihre Durchmesser auf den Kamerabildern durch Angabe der Pixel, die einem Mikrometer entsprechen (hier: 316 Pixel \cong 100 μm), auszumessen und berechnen zu lassen.

Wie bei der Ussing-Kammer-Messung wurden die gleichen Werte bestimmt: transepitheliales Potential V_{te} , die Spannungsänderung ΔV_{te} , der transepitheliale Widerstand R_{te} , der Kurzschlussstrom I'_{sc} , das Diffusionpotential DP und die einzelnen Permeabilitäten P_{Na^+} , P_{Cl^-} und P_{Na^+/Cl^-} .

Das transepitheliale Potential, die Spannungsänderung bei Strominjektion und das Diffusionspotential bei basolateralem Wechsel zu einer Niedrig-NaCl-Lösung konnten vom Schreiberpapier unter Berücksichtigung des eingestellten Verstärkerfaktors abgelesen werden. Von der Spannungsänderung musste der Leerwert des Systems abgezogen werden, das heißt, die Spannungsänderung, die ohne Einspannen eines Tubulus bei Strominjektion vorhanden war.

Nun konnte der transepitheliale Widerstand mit Hilfe der Kabelgleichung berechnet werden:

$$R_{te} = \sqrt{\frac{\pi \times \rho \times \lambda^3 \times \Delta V_{te}}{I_{inj} \times \tanh \frac{l}{\lambda}}} \quad (14)$$

ρ steht für den spezifischen Widerstand der verwendeten Kontrolllösung. Dieser lag bei 34,5 $\Omega \times \text{cm}$. Lambda ist die Längskonstante in μm , I_{inj} der pro Sekunde injizierte Strom von 13 nA und l die Länge in μm .

Der spezifische Widerstand wurde mit Hilfe eines Konduktivitätsmessgeräts (Cond 3110, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland) bei einer Temperatur von 20 °C ausgemessen. Anhand aus der Literatur bekannter Leitwerte für eine 0,1 molare KCl-Lösung bei unterschiedlichen Temperaturen wurde ein Korrekturfaktor von 0,726

für den vom Gerät gemessenen Wert bestimmt (24). So wurde der spezifische Widerstand bei 37 °C, der Badtemperatur, berechnet.

Die Längskonstante wurde ebenfalls im Rahmen der Kabelgleichung berechnet (35):

$$\lambda = \frac{\Delta V_{te} \times \pi \times r^2}{I_{inj} \times \rho} \quad (15)$$

Der Radius r ergab sich aus dem ausgemessenen Durchmesser.

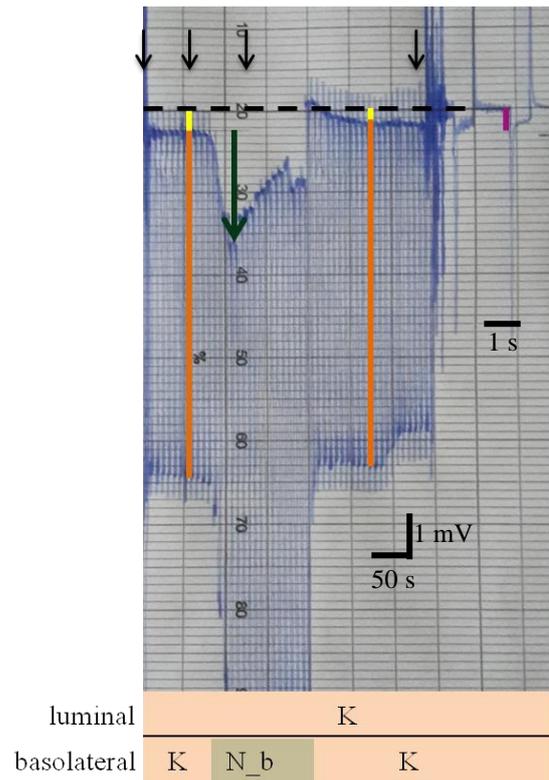
Nach dem Ohmschen Gesetz wurde der Kurzschlussstrom I'_{sc} berechnet:

$$I'_{sc} = \frac{V_{te}}{R_{te}} \quad (16)$$

Das Diffusionspotential $DP_{correct}$ bei basolateralem Wechsel, sowie die Permeabilitätsberechnungen von P_{Na^+/Cl^-} , P_{Na^+} und P_{Cl^-} folgten den gleichen Berechnungen wie bei den Ussing-Kammer-Messungen und werden hier nicht näher ausgeführt (siehe Kapitel 2.4.3).

Abbildung 16: Auswertung der Tubulusperfusion

- K : Kontrolllösung
- Na : Niedrig-NaCl-Lösung
- : V_{te}
- : ΔV_{te}
- : Systemnull
- : Wert zur Leerwiderstandsberechnung
- : Aufnahme eines Fotos
- : Diffusionspotential



2.5.5.4 Fixierung

Es wurden 9 Sprague-Dawley-Ratten für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet, 3 Ratten aus jeder Versuchsgruppe. Hierfür wurden die vorbehandelten Tiere zunächst mit Isofluran 5 Vol.-% in einer Box narkotisiert. Die Menge des Narkosemittels wurde bei der anschließenden Narkose über Maske vorsichtig auf 3,7 Vol.-% reduziert, um eine Atemdepression der Tiere zu vermeiden.

Der Bauch der Tiere wurde mit Öl bestrichen, um die Fellhaare aus dem Arbeitsfeld zu halten. Mithilfe eines medianen Längsschnitts wurde der Bauchraum eröffnet, die Aorta freigelegt und anschließend mit Wattestäbchen von darüber liegenden Gewebebestandteilen wie z.B. Fett befreit.

Der Abgang der V. renalis von der V. cava inferior, die direkt neben der Aorta verläuft, wurde aufgesucht. Oberhalb des Abgangs der A. renalis sinistra wurde die Aorta mit einer Klemme verschlossen (Clipping). Zur Kontrolle diente hierbei der Pulsationsstopp der Aorta nach dem Clipping. Im Anschluss fand das Clipping der Aorta unterhalb der Abgänge der A. renalis sinistra statt.

Je nach Durchmesser der Aorta wurde diese mit einer Kanüle unterschiedlicher Größe (21 G 1 ½ oder 22 G 1 ¼) kanüliert. An der Kanüle war das Perfusionssystem angeschlossen. Dieses Perfusionssystem bestand aus zwei 50 ml-Spritzen, die auf einer Höhe von 2,5 m vom Boden

und damit ca. 1,5 m vom Operationstisch entfernt angebracht wurden. Von den zwei Spritzen ging jeweils ein Schlauch aus. Diese endeten in einem gemeinsamen Endstück und konnten über Dreiwegehähne einzeln reguliert werden. Das Endstück war mit einer Kanüle verbunden. Vor der Perfusion der Niere wurden die Schläuche gespült und mit den Lösungen blasenfrei vorgefüllt. Das Perfusionssystem enthielt in einem Schenkel PBS + 1% Procain und im anderen Schenkel mit PBS + 4% PFA + 1% Procain.

Nach Kanülierung der Aorta wurde die V. cava inferior durchtrennt die Niere zunächst mit PBS + 1% Procain gespült. Im Anschluss folgte PBS + 4% PFA + 1% Procain.

Auf Grund des mangelnden Clippings oberhalb der rechten A. renalis, fand hauptsächlich eine Perfusion der linken A. renalis und somit der linken Niere statt.

Die linke Niere wurde dem Bauchraum entnommen, von ihrer Kapsel befreit und anschließend in Scheiben von ca. 0,5 cm in Verlaufsrichtung der Nephrone geschnitten. Die Pole, die kein inneres Nierenmark enthielten, wurden verworfen.

Die fertigen Scheiben wurden in ein mit PFA-haltiger Perfusionslösung gefülltes Röhrchen (76 × 20 mm, Sarstedt AG und Co, Nümbrecht, Deutschland) überführt und für 1 h im Kühlschrank bei 4 °C belassen. Anschließend wurde die Perfusionslösung gegen PBS + 20% Saccharose getauscht und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Die Saccharoselösung diente als Frostschutzmittel für die Nierenscheiben.

Am nächsten Tag wurden die Nierenscheiben in vorgeformte, auf die Scheibengröße angepasste Aluschälchen flach hineingelegt. Anschließend wurden die Aluschälchen mit Eindeckmedium (Leica Jung Tissue Freezing Medium, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) aufgefüllt, sodass die Nierenscheiben gänzlich bedeckt waren. So wurden die Nierenscheiben erneut für 1 h belassen, um ein Durchdringen mit dem Eindeckmedium zu ermöglichen. Nach 1 h wurden die Aluschälchen in einer Nierenschale mit flüssigem N₂ schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.5.5.5 Herstellung der Kryoschnitte

Für die Herstellung der Kryoschnitte wurden die von Eindeckmedium umgebenden Nierenscheiben mit Hilfe zweier Pinzetten im auf – 20 °C gekühlten Kammerraum des Kryostats (Research Cryostat Leica CM3050, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) von der Aluminiumschale befreit. Im Anschluss wurde die Nierenscheibe mit weiterem Eindeckmedium auf einem Block fixiert und dieser im passenden Winkel zum Messer arretiert. Durch Vorschub des Blocks wurden Nierenschnitte von 3 µm Dicke hergestellt, mit Hilfe von

Pinselfn glatt gestrichen und auf Objektträger aufgenommen.

Diese Kryoschnitte wurden bis zum Färbevorgang bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.6 Immunfluoreszenz

2.6.1 Extern vorbehandelte Versuchstiere

Neben den IMCD-Kulturen und den Ratten aus dem Tierversuch wurden Kryoschnitte von vorbehandelten Sprague-Dawley-Ratten auf ihre Claudinexpression untersucht. Diese wurden freundlicherweise von A. Paliege aus der Arbeitsgruppe Nieren- und Kreislaufforschung der Charité Berlin zur Verfügung gestellt. Die genaue Behandlung der Versuchstiere wurde bereits in Publikationen dieser Arbeitsgruppe beschrieben (27, 92).

Es handelte sich um Kryoschnitte von Kontrolltieren ohne Behandlung, von Ratten die über 3 Tage per osmotischer Minipumpe $0,5\text{ ng/h}$ dDAVP oder 12 mg/d Furosemid bekommen hatten. Es standen Kryoschnitte von vier unterschiedlichen Tieren für jede der drei Behandlungsgruppen zur Verfügung. Die Kryoschnitte wurden bis zum Färbevorgang bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.6.2 Färbung

Für die Färbungen der Filter und der Kryoschnitte von extern vorbehandelten Versuchstieren sowie der Tiere aus dem selbst durchgeführten Tierversuch wurden verschiedene Erst-Antikörper verwendet, die in der Tabelle 8 aufgeführt sind.

Tabelle 8: Erst-Antikörper

Antigen:	Wirt	Verdünnung	Herkunft des Antikörpers
Claudin 2	Kaninchen	1:300	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Claudin 3	Kaninchen	1:300	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Claudin 4	Maus	1:300	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Claudin 7	Kaninchen	1:300	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Claudin 8	Kaninchen	1:300	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Claudin 10	Maus	1:300	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Claudin 16	Kaninchen	1:300	Dr. Jianghui Hou, Washington University Renal Division, St. Louis, MO, USA
Claudin 18	Kaninchen	1:300	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Claudin 19	Kaninchen	1:300	Dr. Jianghui Hou, Washington University Renal Division, St. Louis, MO, USA
AQP 1	Ziege	1:300	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA
AQP 2	Kaninchen	1:100	Almone labs, Jerusalem, Israel
AE 1	Meerschweinchen	1:500	Dr. Carsten Wagner, Physiologisches Institut, Universität Zürich, Schweiz

Für die IMCD-Kulturen wurden als Erst-Antikörper Claudin 7, 19 und AQP2, für die extern vorbehandelten Versuchstiere Claudin 4, 7, 10, 16, 18 und 19 sowie für die Tiere des eigenen Tierversuchs Claudin 2, 3, 4, 7, 8, 10, 16 und 19 in Kofärbung mit AQP1 oder AE1 verwendet. Die verwendeten Zweitantikörper sind in Tabelle 9 aufgelistet und wurden zum Teil in Kombination verwendet.

Tabelle 9: Zweit-Antikörper

Zweit-Antikörper	Wirt	Verdünnung	Herkunft des Antikörpers
Anti-mouse-Alexa 488	Ziege	1:400	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Anti-rabbit-Alexa 488	Esel	1:400	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Anti-goat-Alexa 488	Esel	1:400	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Anti-mouse-Alexa 594	Esel	1:400	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Anti-goat-Alexa 594	Esel	1:400	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Anti-rabbit-Alexa 633	Ziege	1:400	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-guinea pig-Alexa 488	Ziege	1:400	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA

Die genaueren Färbevorgänge werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

2.6.2.1 IMCD-Kultur

Die zur Fixierung verwendete PFA-Lösung (siehe Kapitel 2.5.5.4) wurde aus den Kompartimenten des mit den Kulturen bewachsenen Filters abpipettiert, die Kompartimente mit 1 ml PBS-T (0,3% Triton in PBS) aufgefüllt und anschließend für 10 min mit Hilfe eines Kombischüttlers (KL-2, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland) bei einer Drehzahl von 50 pro Minute weiter von der PFA-Lösung gereinigt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das Triton diente als Detergens, um die Membran für die Antikörper durchlässiger zu machen.

Nach dem Waschen wurde in das untere Kompartiment je 200 µl PBS-T und in das obere Kompartiment je 50 µl PBS-T mit 1% BSA (*engl. bovine serum albumin*) und dem 1. Antikörper (Claudin 19, 7 oder AQP2) pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden zunächst das PBS-T sowie die Antikörperlösung abpipettiert und die Filtermembranen für dreimal 10 Minuten lang mit jeweils frischem PBS-T gewaschen. Anschließend wurden jeweils 200 µl frisches PBS-T ins basolaterale und 50µl PBS-T mit Phalloidin (1 : 2000; Life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) und dem 2. Antikörper (anti-rabbit Alexa 633) in das luminale Kompartiment pipettiert

und für 1 h auf dem Kombischüttler bei einer Drehzahl von 50 pro Minute vor Licht geschützt inkubiert.

Nach einstündiger Inkubation mit dem 2. Antikörper wurden die Filtermembranen erneut gewaschen. Nach Abpipettieren der Lösungen wurde die Filtermembran anschließend vorsichtig mithilfe einer Schere, deren Schneide an dem Rand der Filtermembranen entlang geführt wurde, vom Rest des Filters gelöst. Die Filtermembran wurde dabei durch eine Pinzette so weit wie möglich am Rand festgehalten, um nur wenige Artefakte auf der Filtermembran zu erhalten. Die Filtermembranen wurden mit Hilfe einer Pinzette mit dem Zellbesatz nach oben auf vorbereitete Objektträger (Polysine Slides, Thermo scientific, Waltham, USA) abgelegt. Damit sich die Filtermembranen möglichst glatt auf dem Objektträger ausbreiteten, wurden diese auf kleine Tropfen PBS abgelegt und so an den Objektträger gesaugt. Mit Hilfe von Mowiol/Dabco und 0,5% Dapi (4',6-Diamidin-2-phenylindol; Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurden die Filtermembranen mit einem Deckglas eingedeckt. Mowiol diente der Fixation des Deckplättchen und Dapi zur Anfärbung der Zellkerne. Zum Aushärten wurden die Objektträger lichtgeschützt bis zum nächsten Tag gelagert und konnten dann mit dem Mikroskop betrachtet werden.

2.6.2.2 Färbung von Kryoschnitten

Die Kryoschnitte der extern vorbehandelten Ratten und die der Tiere aus dem eigenen Tierversuch wurden zunächst dreimal mit deionisiertem Wasser in einer Färbeküvette gewaschen und anschließend in PBS-T in der Mikrowelle (MM41580, Medion AG, Essen, Deutschland) für 5 Minuten lang auf höchster Stufe erhitzt und das PBS-T zumindest einmalig zum Kochen gebracht. Danach kühlten die Objektträger für weitere 30 Minuten lang ab. Anschließend wurden sie in eine mit PBS-T gefüllte neue Färbeküvette überführt und dreimal auf einem Kombischüttler (50 rpm) gewaschen.

Für die Färbung mit dem Erst-Antikörper wurden die Schnitte der Färbeküvette entnommen und das PBS-T mit Papiertüchern so gut wie möglich um die Schnitte herum entfernt. Der Erst-Antikörper war in PBS-T mit 1% BSA angesetzt (Tabelle 8). Pro Objektträger wurden nun 75 µl der Antikörper-Lösung auf die Kryoschnitte pipettiert, anschließend mit Deckplättchen luftdicht abgedeckt und die Kryoschnitte über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank in feuchten Kammern gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger erneut in eine mit PBS-T gefüllte Färbeküvette gestellt und kurze Zeit gewartet, bis sich die Deckplättchen von alleine von den Objektträgern gelöst hatten. Dann wurden die Objektträger in eine weitere mit PBS-T gefüllte Färbeküvette

überführt und die Kryoschnitte wie am Tag zuvor dreimal für 10 Minuten lang mit jeweils frischem PBS-T auf dem Schüttler gewaschen.

Im Anschluss wurden die Objektträger ebenfalls wieder mit Papiertüchern um die Schnitte herum vom PBS-T befreit und 100 µl eines in PBS-T gelösten Zweit-Antikörpers auf die Objektträger pipettiert (Tabelle 9). Die Objektträger wurden ohne Deckplättchen in den feuchten Kammern lichtgeschützt für 1 h inkubiert.

Nach der einstündigen Inkubationsphase wurden die Objektträger erneut in eine Färbeküvette mit PBS-T überführt und lichtgeschützt unter einem Handtuch dreimal für jeweils 10 Minuten lang in jeweils frischem PBS-T auf dem Schüttler bei gleicher Drehzahl gewaschen.

Im Anschluss wurden die Objektträger zügig mit Tüchern um die Schnitte herum vom PBS-T befreit, um die Zeit der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zweit-Antikörper am Licht so gering wie möglich zu halten. Es wurde gewartet, bis die Gewebe vollständig getrocknet waren, um die Haltbarkeit der Präparate zu verlängern, und anschließend mit einer Pipette und leicht gekürzter Pipettenspitze jeweils ein kleiner Tropfen Mowiol/Dabco und Dapi (0,5 µl/ml Mowiol) auf die einzelnen Gewebeschnitte gegeben und luftdicht mit einem Deckplättchen unter Verwendung von Handschuhen eingedeckt.

Ab dem nächsten Tag standen die Präparate zur Auswertung zur Verfügung.

2.6.3 Auswertung

Zur Auswertung der Claudinexpressionen wurden die Filter und die Kryoschnitte durch 2 verschiedene Mikroskope angeschaut: ein konfokales Laserscanmikroskop und das AX 10.

Das Laserscanmikroskop LSM 510 (*engl. laser scanning mikroskop*; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) besaß ein eingebautes inverses Axiovert 200 M Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). Das konfokale Lasermikroskop ermöglichte es, bestimmte fokale Ebenen in hoher Auflösung anzuschauen. Hierfür wurden 2 Laser verwendet, deren Licht von 488 nm und 633 nm über den Hauptfarbteiler (HFT) mit dichroitischem Spiegel auf die Schnitte leuchtete. Das von den fluoreszenzmarkierten Antikörpern emittierte Licht von ca. 520 nm und 650 nm konnte den HFT passieren. Am Nebenfarbteiler wurden die beiden Wellenlängen durch Bandfilter (siehe Abbildung 17) getrennt und zu den entsprechenden Detektoren durchgelassen bzw. gespiegelt. Die Detektor-Blende erlaubt dabei das Fokussieren auf eine Bildebene.

Zusätzlich verfügte das LSM über die Möglichkeit, über geeignete Filtersätze, für Emission und Exzitation, und eine Fluoreszenzlampe (HBO; Zeiss MBQ 52 AC, Carl Zeiss AG,

Oberkochen, Deutschland) die Epifluoreszenz direkt zu betrachten und zu beurteilen.

Das AX 10 verfügte über verschiedene Filtersätze für Exzitation und Emission, um das getrennte Betrachten von DAPI bei 340 nm, Alexa 488 bei 488 nm und Alexa 594 bei 594 nm zu ermöglichen. Des Weiteren verfügte es über einen automatisierten Mikrosokoptisch, der erlaubte, den gesamten Bereich eines Schnitts oder Filters in hochauflösender Qualität zu fotografieren und zu einem Bild zusammensetzen.

Das AX10 war zusätzlich mit einem ApoTome (ApoTome.2, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) ausgestattet, mit dem optische Schnitte ähnlich zum LSM erstellt werden konnten. Durch ein Gitter wurde eine strukturierte Beleuchtung erzeugt. Aus Bildern unter verschiedenen Gitterpositionen wurde wiederum ein Bild der Schnittebene ohne Streulicht berechnet und dargestellt.

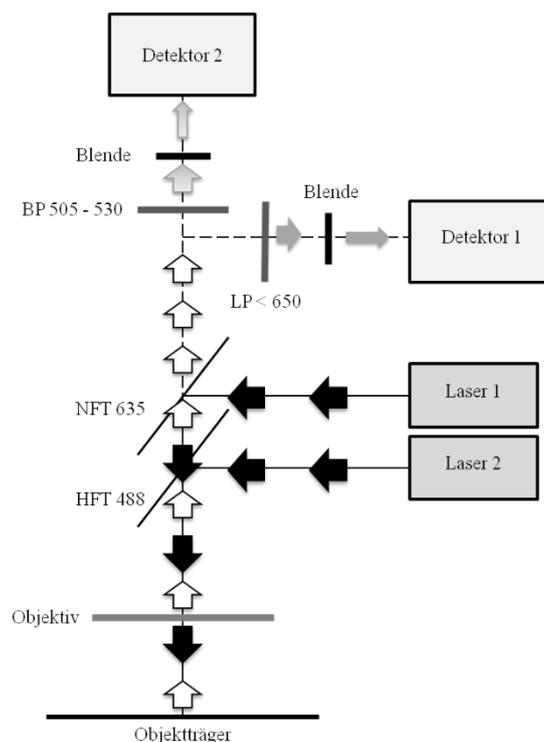


Abbildung 17: LSM-Schema

Mit den Pfeilen ist beispielhaft den Strahlengang des Lichts verdeutlicht. Der Laser 1 gibt Licht mit einer Wellenlänge von 633 nm ab, der Laser 2 mit einer Wellenlänge von 488 nm, welches das Präparat auf dem Objektträger erreicht und Fluoreszenzlicht erzeugt. Dieses Licht wird vor Erreichen der Detektoren über einen Breitbandfilter, der Licht zwischen 505 nm und 530 nm durchlässt, sowie einen Langpassfilter, der Licht mit einer Wellenlänge von über 650 nm durchlässt, weiter aufgeteilt. Die Detektorblende ermöglicht ein Fokussieren auf der zu beobachtenden Bildebene.

Filtermembranen in einer einlagigen und komplett konfluenten Zellschicht gewachsen sein. Dies wurde am AX 10 und mit der Software ZEN (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) an Übersichtsaufnahmen der mit Phalloidin gefärbten Strukturen durchgeführt.

Die Filtermembranen wurden auf diese Weise nach Löchern abgesucht (Abbildung 18, Filter 1). Artefakte, die durch den Färbeprozess entstanden waren, ließen sich gut von natürlich entstandenen Löchern abgrenzen und galten nicht als Ausschlusskriterium für die Verwertung der Ussing-Kammer-Messergebnisse. Filter mit nicht mit Zellen bewachsenen Bereichen (Abbildung 18, Filter 2) wurden ausgeschlossen, ebenso Filter, bei denen der transepitheliale Widerstand über $900 \Omega \times \text{cm}^2$ lag und bei denen keine einlagige Zellschicht vorhanden war. Anschließend wurden die Filter in der Übersichtsaufnahme auf den Anteil der dünnen Schleifen untersucht. Sie waren als Nester anders gefärbter Strukturen sichtbar (Abbildung 18, Filter 3). Bei allen Filtern mit einer einlagigen Zellschicht und keinen Löchern wurde die Claudinexpression anschließend ausgewertet.

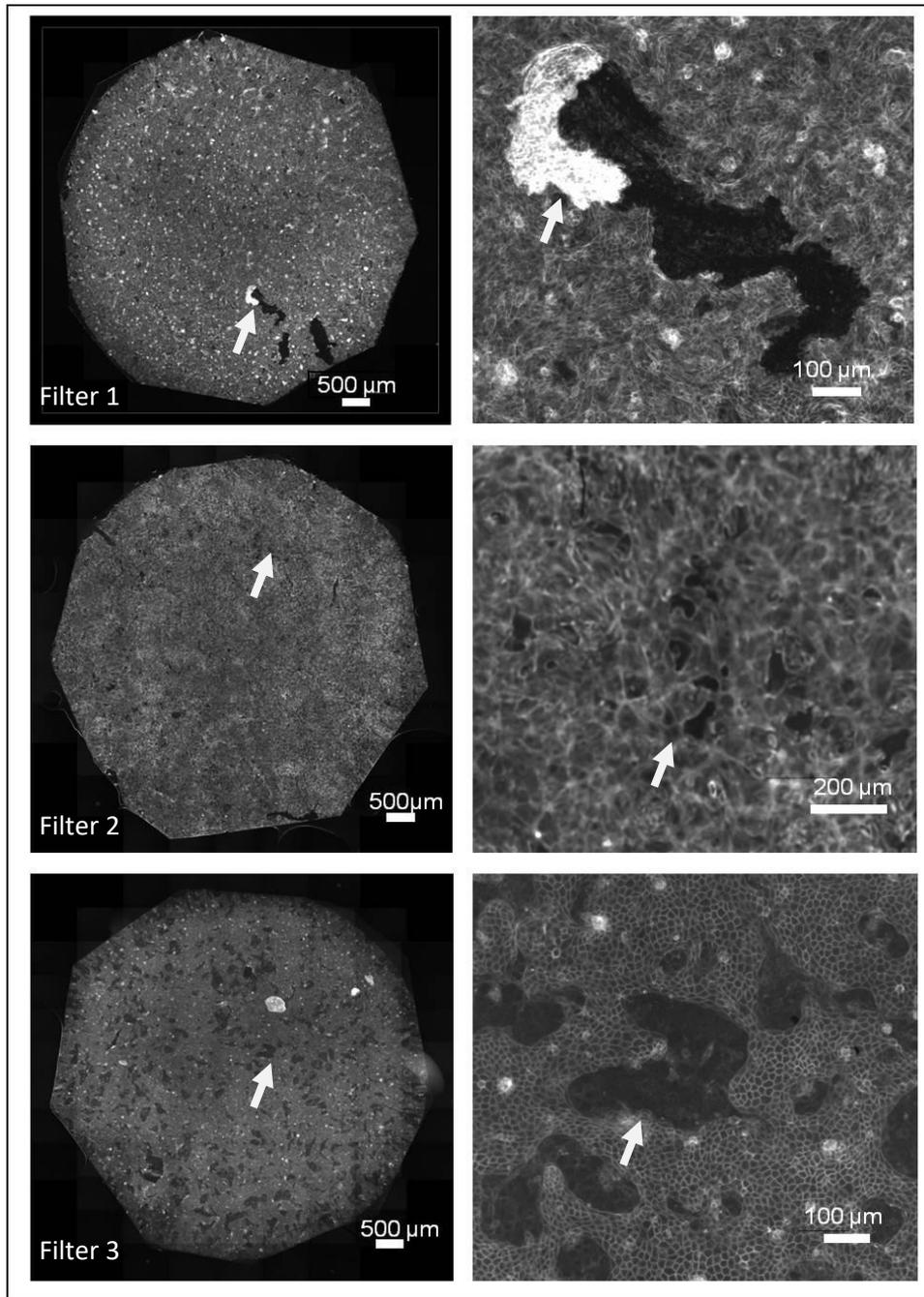


Abbildung 18: Konfluenzanalyse

Auf der linken Seite der Abbildung sind drei Filter nach dem Scannen zur Konfluenzanalyse zu erkennen, auf der rechten Seite jeweils ein vergrößerter Ausschnitt dieser Filter.

Filter 1 zeigt ein Beispiel für ein Artefakt durch die Benutzung von Pinzetten beim Festhalten des Filters. Der Pfeil (↗) zeigt auf den durch Kraft von außen bewirkten Randsaum.

Filter 2 zeigt ein Filter nach Absinken der Widerstände. Zu sehen ist ein unstrukturiertes Wachstumsmuster sowie natürlich entstandene Löcher (↗).

Filter 3 zeigt ein Filter durchsetzt mit Zellen von dünnen Schleifen. Der Pfeil (↗) zeigt auf eines dieser Nester. Die Intensität der Färbung ist hier deutlich abgeschwächt. Das strukturierte Wachstum der im Epithelverband gewachsenen Zellen ist hier gut erkennbar.

2.6.3.1.2 Auswertungskriterien

Für die Auswertung der Claudinexpression wurde das konfokale Laserscannmikroskop verwendet. Zuerst wurden die Filter bei Beleuchtung mit Wellenlänge 488 nm und 633 nm mit den Augen in Schlangenlinien durchgemustert. Es wurden Dichte und Regelmäßigkeit des Claudinnetzes beschrieben.

Für die genauere Beurteilung des Claudinnetzes wurden drei Kategorien der Verteilung der Claudine festgelegt: membranär, submembranär und vesikulär, die in einem Punktesystem im Hinblick auf ihre Häufigkeit bewertet wurden (Tabelle 10 und Abbildung 19):

Tabelle 10: Expressionsmuster

Punkte	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5
Häufigkeit in %	<12,5	≥12,5	≥25	≥37,5	≥50	≥62,5	≥75	≥87,5

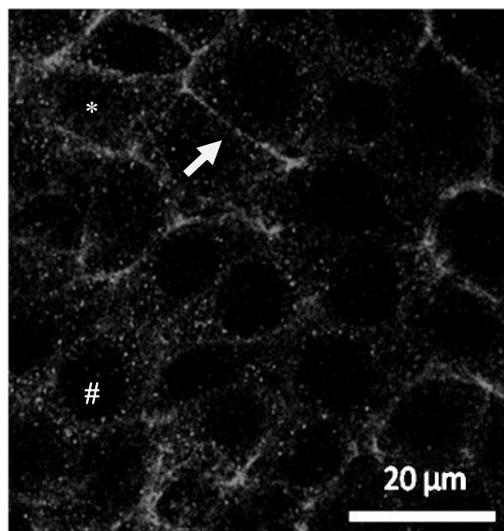


Abbildung 19: Expressionsmuster

Ausschnitt eines Claudin 19 gefärbten Filters mit den 3 verschiedenen Expressionsmustern:

- Membranär (↗)
- Submembranär (*)
- Vesikulär (#)

Die Intensität der Claudinfärbung wurde ebenfalls durch ein Punktesystem festgehalten (Tabelle 11):

Tabelle 11: Intensität der Claudinfärbung

Punkte	0	1	2	3	4
Intensität	sehr niedrig	niedrig	mittel	hoch	sehr hoch

Färbungen mit einer Intensität von Null waren zu schlecht erkennbar, als dass die Claudine näher ausgewertet werden konnten.

Abschließend wurde der prozentuale Anteil der Zellen dünner Schleifen, die selbst nach vorheriger Aufreinigung in der Zellkultur (siehe Kapitel 2.3.3) vorhanden waren, angegeben.

Es wurden exemplarische Bilder mit dem LSM erstellt.

2.6.3.2 Extern vorbehandelte Versuchstiere

Die einzelnen Schnitte wurden systematisch in Schlangenlinien unter Verwendung der Fluoreszenzlampe abgefahren, bevor die einzelnen Zonen der Niere betrachtet wurden. So konnte ein Gesamteindruck der Färbung erlangt und Auffälligkeiten außerhalb des inneren Nierenmarks nicht übersehen werden.

Im Anschluss wurde das gesamte Augenmerk auf das innere Nierenmark gelegt und auf qualitative Unterschiede der Claudinexpression zwischen den drei Behandlungsgruppen geschaut. Eine quantitative Auswertung wurde nicht durchgeführt, da geringe Unterschiede mit dem bloßen Auge nicht erkennbar waren.

Es wurden exemplarische Bilder mit dem LSM erstellt. Zusätzlich wurde beispielhaft ein Schnitt mit dem AX10 hochauflösend abfotografiert und gescannt (Abbildung 20).

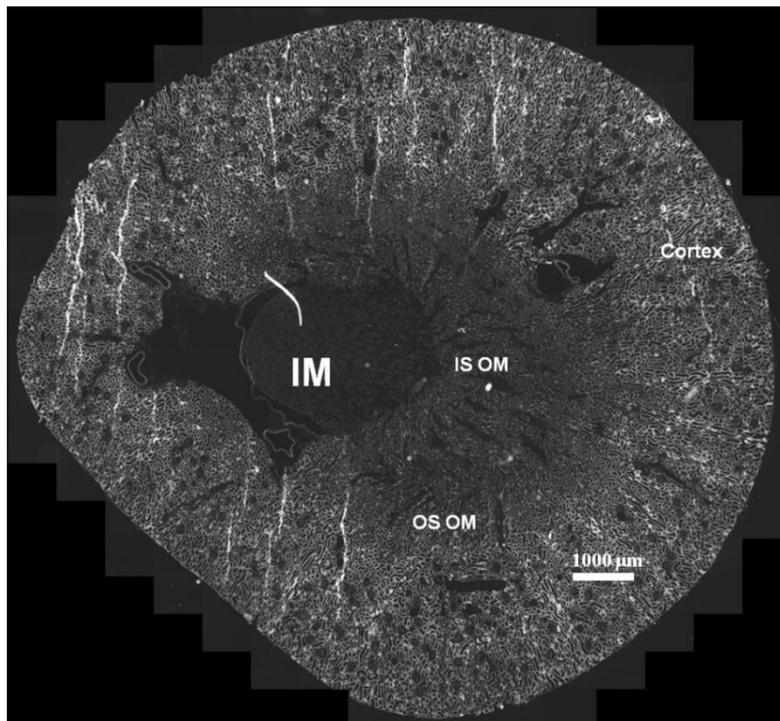


Abbildung 20: Claudin 19 gefärbter Nierenschnitt

Claudin 19 gefärbter Nierenschnitt: Die unterschiedlichen Zonen der Niere sind markiert. Maßstab 1000 µm

2.6.3.3 Tierversuch

An den Schnitten aus dem Tierversuch fand lediglich eine Expressionsanalyse nach qualitativen Gesichtspunkten am AX10 mit ApoTome statt.

Zur Unterscheidung der Expression der Claudine in aTL und in dTL wurden zum einen Übergänge von IMaTL in die TAL aufgesucht, sowie das ISOM aufgesucht. Da im ISOM nur dTL vorkommen und Übergänge von IMaTL in die TAL gut zu finden waren, war eine Unterscheidung der TLs hier möglich und somit die Claudinexpression der jeweiligen TL-Art zuzuordnen.

2.7 Statistik

Sämtliche Daten, die auf Signifikanz überprüft wurden, wurden auf gleiche Art und Weise untersucht.

Zunächst wurden sie durch den Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Alle nicht normalverteilten Werte, bei denen kein multiples Testen notwendig war, wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummen-Tests auf Signifikanz getestet ($\alpha \leq 0,05$). Alle Werte, die normalverteilt waren, wurden mit Hilfe des Levene-Tests auf Varianzhomogenität geprüft.

Werte mit Varianzhomogenität wurden mit dem T-Test, Werte mit Varianzheterogenität mit dem Welch-Test auf Signifikanz untersucht ($\alpha \leq 0,05$). Dies gilt ebenfalls nur für die Daten, bei denen kein multiples Testen notwendig war. Bei allen Daten, bei denen multiples Testen notwendig war, wurden normalverteilte und varianzhomogene Daten mit Hilfe der ANOVA untersucht, während nicht normalverteilte oder varianzheterogene Daten mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test und anschließender Dunn-Korrektur untersucht wurden. Auch hier wurde α mit 0,05 festgelegt.

Für die statistischen Tests standen das Programm „R“, „SPSS“ und „MATLAB“ zur Verfügung.

3 Ergebnisse

3.1 IMCD Zellen als *in vitro*-Modell des inneren Nierenmarks

In den Primärzellkultur-Versuchen wurde der Einfluss unterschiedlicher Osmolalitäten *in vitro* auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der kultivierten IMCD-Zellen sowie die Auswirkung von AVP, Aldosteron und Cyclosporin A untersucht. Im Anschluss wurden die Expressionsmuster von Claudin 7 und 19 näher betrachtet.

3.1.1 Auswirkung plasmahypertoner Osmolalität auf IMCD-Kulturen

3.1.1.1 Unterschiede während der Kultivierung

Wie bereits im Material- und Methoden-Teil erwähnt, verhielten sich die IMCD-Zellen bei der Kultivierung unter 300 mOsm/kg- und 600 mOsm/kg-Bedingungen unterschiedlich. Die Kulturen werden im Folgenden als 300 mOsm-Kulturen und 600 mOsm-Kulturen bezeichnet. Die Widerstandskurve der 600 mOsm-Kulturen verlief wesentlich flacher und zeigte keine exponentielle Phase (Abbildung 21).

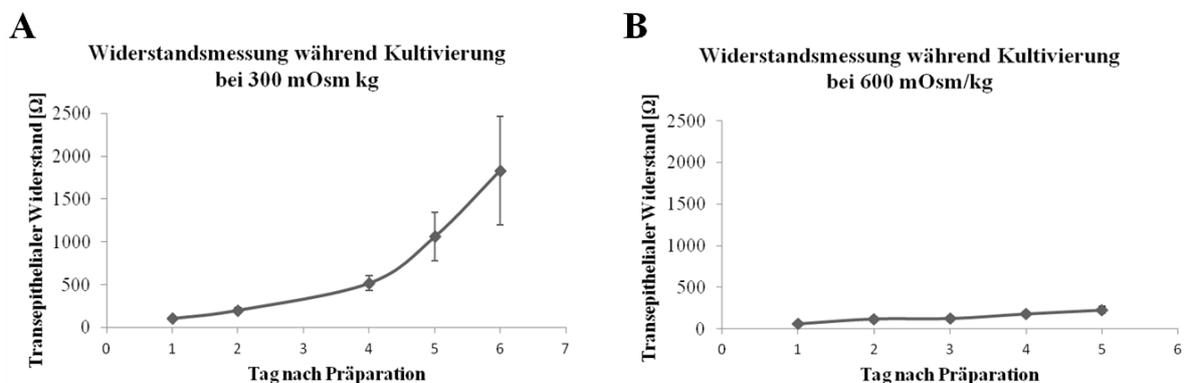


Abbildung 21: Widerstandsmessung bei unterschiedlichen Kulturbedingungen

Grafik (A) zeigt den Verlauf der transepithelialen Widerstände unter 300 mOsm/kg-Kulturbedingungen (132 Filter), während Grafik (B) die transepithelialen Widerstände an einzelnen Tagen nach der Präparation bei 600 mOsm/kg (58 Filter) zeigt. Gut zu beobachten ist, dass der transepitheliale Widerstand unter 300 mOsm/kg stärker ansteigt. Fehlerindikatoren sind bei 600 mOsm/kg für die Skalierung zu gering und deshalb nicht sichtbar.

3.1.1.2 Elektrophysiologische Unterschiede

Auch bei den finalen Messungen in der Ussing-Kammer zeigten sich deutliche Unterschiede im trans- und parazellulären Transport zwischen den beiden Kulturbedingungen (Abbildung 22

und 23). Unter 300 mOsm/kg gab es zudem zwei sich parazellulär unterschiedlich verhaltende Kulturgruppen (s.u.). Einen signifikanten Unterschied in den transzellulären Parametern gab es zwischen diesen Gruppen nicht, wohl aber jeweils Unterschiede zu den 600 mOsm-Kulturen. Der Unterschied in den Widerständen, der schon während der Kultivierung gemessen worden war, zeigte sich auch bei den Ussing-Kammer-Messungen (Abbildung 23, B). Die Messungen belegten zudem, dass die kultivierten IMCD-Zellen ein kaum vorhandenes transepitheliales Potential hatten (Abbildung 23, C), bei den 300 mOsm-Kulturen aber etwas lumennegativer als bei den 600 mOsm-Kulturen. Der resultierende I'_{sc} war jedoch zwischen den Gruppen nicht mehr unterschiedlich (Abbildung 23, D). Der große Anteil von $\Delta I'_{sc \text{ amil}}$ am I'_{sc} (Abbildung 23, C und D) macht deutlich, dass fast sämtliche elektrogenen Transportvorgänge durch Blockierung des ENaC mit Amilorid unterbunden werden konnten.

Der parazelluläre Weg wurde mit Hilfe von NaCl-Diffusionspotentialen untersucht. Hier zeigten sich, wie bereits erwähnt, bei der Kultivierung unter 300 mOsm/kg zwei sich komplett gegensätzlich verhaltende Kulturgruppen, die zwischen IMCD-Kulturansatz und Ratte variierten. Daher werden diese Gruppen auch im Verlauf einzeln betrachtet.

Unter 300 mOsm/kg -Bedingungen gab es einige Kulturen (Abbildung 22), die ein positives Diffusionspotential ($n = 13$) besaßen ($1,67 \pm 0,42$ mV) und einige mit einem negativen Diffusionspotential ($n = 9$) von $-10,04 \pm 1,01$ mV. Welche Kultur- oder Präparationsbedingungen im Wesentlichen für diese Eigenschaften verantwortlich waren, konnte nicht geklärt werden.

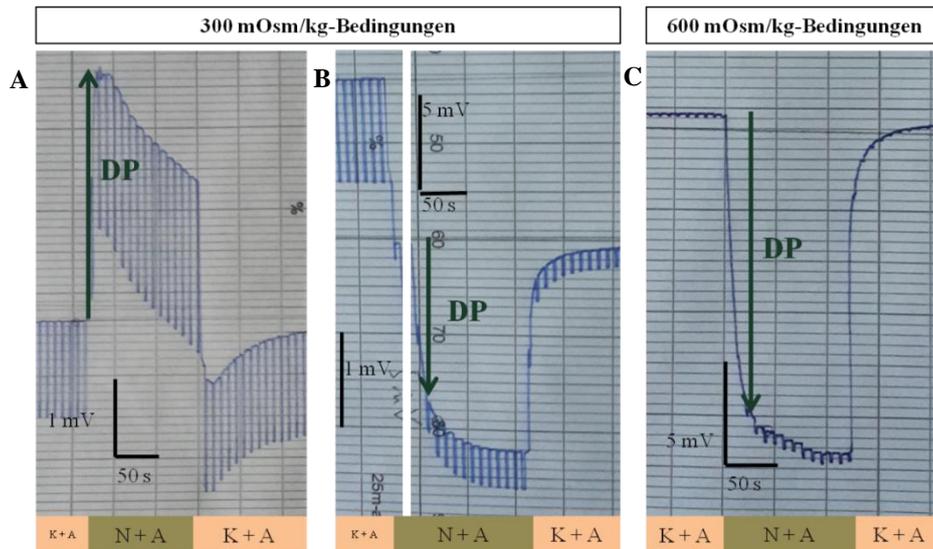


Abbildung 22: Originalaufzeichnungen von DP's unterschiedlicher Osmolalitätsbedingungen

Diffusionspotentiale (Pfeil) der zwei verschiedenen Kulturgruppen unter 300 mOsm/kg-Bedingungen (A und B) und ihr Vergleich mit dem Diffusionspotential eines Filters bei 600 mOsm/kg-Bedingungen (C) sind abgebildet. Zu beachten ist hier die unterschiedliche Skalierung der Schreiberpapiere, insbesondere bei B (zum besseren Verständnis daher geteiltes Bild). Der Ursprung des Pfeils ist der neue Bezugspunkt, auf den das Potential unter Kontrollbedingungen wieder zurückgeht.

Die 600 mOsm/kg-Kulturen zeigten durchweg negative Diffusionspotentiale und es ergab sich ein deutlicher Unterschied zu den Kulturen mit positivem DP bei 300 mOsm/kg. Die Spannungsänderung bei lumenalem Wechsel auf eine Niedrig-NaCl-Lösung (Abbildung 23, E) war deutlich ausgeprägter nach Kultivierung bei 600 mOsm/kg. Unter 300 mOsm/kg-Bedingungen waren die parazellulären Wege hier wesentlich weniger anionenselektiv als unter 600 mOsm/kg (Abbildung 23, F). Die parazellulären Eigenschaften der Kulturen mit negativem Diffusionspotential lagen zwischen denen mit positivem Diffusionspotential unter 300 mOsm/kg und denen unter 600 mOsm/kg, zeigten aber transzellulär die gleichen Eigenschaften wie die Kulturen mit positivem DP unter 300 mOsm/kg. Die Veränderungen waren parazellulär also abgeschwächt sichtbar.

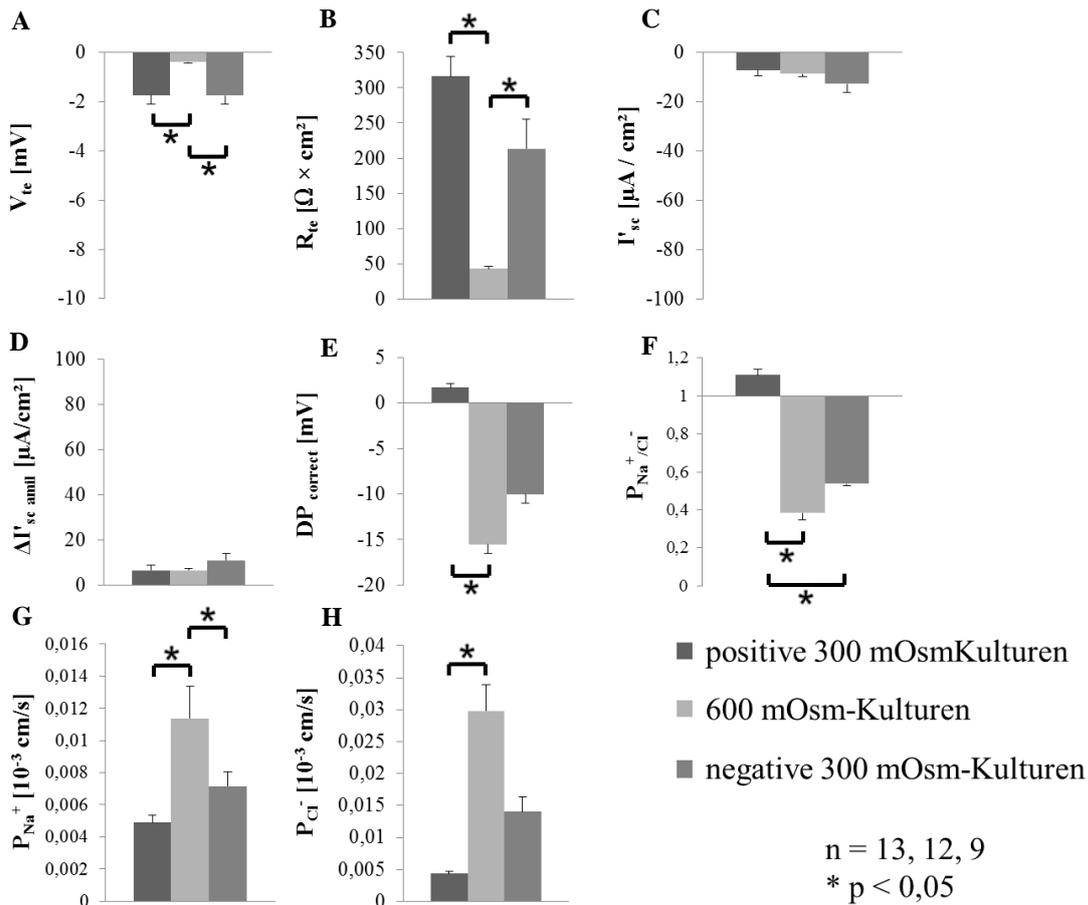


Abbildung 23: Vergleich elektrophysiologischer Parameter unter verschiedenen Osmolalitätszuständen

Dargestellt sind das transepitheliale Potential V_{te} (A), der transepitheliale Widerstand R_{te} (B), der berechnete equivalente Kurzschlussstrom I'_{sc} (C), der durch Amilorid hemmbare Kurzschlussstrom $\Delta I'_{sc\ amil}$ (D), das um das LJP korrigierte Diffusionspotential $DP_{correct}$ (E), die Permeabilität von Cl^- über Na^+ P_{Na^+/Cl^-} (F), die Natriumpermeabilität P_{Na^+} (G) und die Chloridpermeabilität P_{Cl^-} (H). Signifikante Unterschiede sind durch Stern und Klammer gekennzeichnet.

3.1.1.3 Immunfluoreszenzauswertung nach unterschiedlicher Kultivierung

Alle in der Elektrophysiologie ausgewerteten Filter wurden im Anschluss auf ihr Claudinexpressionsmuster untersucht. Abbildung 24 zeigt ausgewählte Ausschnitte verschiedener Filter. Deutlich zu sehen ist das vermehrt membranäre Muster unter 300 mOsm/kg-Bedingungen sowohl bei der Claudin 19- als auch bei der Claudin 7-Färbung. Bei der Claudin 19-Färbung überwiegt bei 600 mOsm/kg ein vesikuläres Muster, bei der Claudin 7-Färbung ein submembranäres Expressionsmuster.

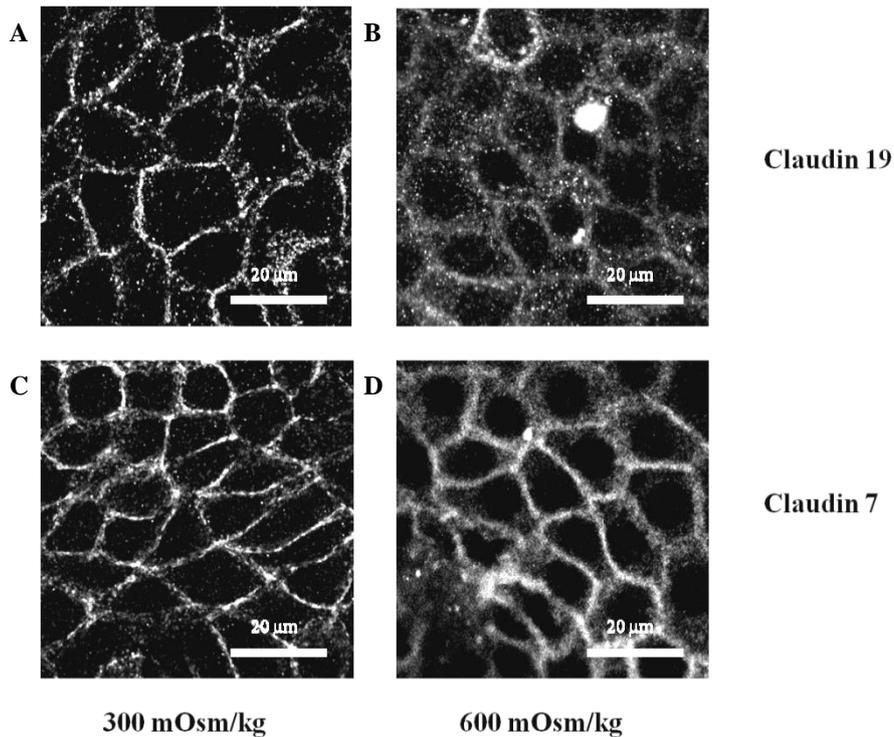


Abbildung 24: Immunfluoreszenzbilder nach unterschiedlicher Osmolalitätsbehandlung

Bild (A) und (B) zeigen Ausschnitte Claudin 19 gefärbter Filter, wobei (A) bei 300 mOsm/kg und (B) bei 600 mOsm/kg kultiviert wurden. In der Reihe darunter zeigt Bild (C) einen Ausschnitt eines mit 300 mOsm/kg kultivierten Filters, der mit Claudin 7 gefärbt wurde, wohingegen das Filter von Bild (D) 600 mOsm/kg-Bedingungen ausgesetzt war. Deutlich zu erkennen ist hier jeweils die Zunahme des submembranären Anteils der Claudine bei den höherosmolaren Kulturbedingungen.

In Abbildung 25 ist die Gesamtauswertung für die Claudin 19- und 7-Färbungen jeweils in Gegenüberstellung der beiden untersuchten Kulturbedingungen zusammengestellt und zeigt einen signifikanten Unterschied bei beiden Kulturen in Bezug auf das Vorhandensein der membranären, submembranären und vesikulären Claudinexpression. Da die Claudinexpressionsmuster sich insgesamt nicht zwischen den beiden 300 mOsm-Kulturgruppen unterschieden, wurden diese zusammengefasst.

Bei höherer Osmolalität nimmt die membranäre Verteilung deutlich zugunsten der beiden anderen Expressionsmuster ab, wobei insgesamt das vesikuläre Expressionsmuster in den Claudin 7-Kulturen weniger zu sehen war.

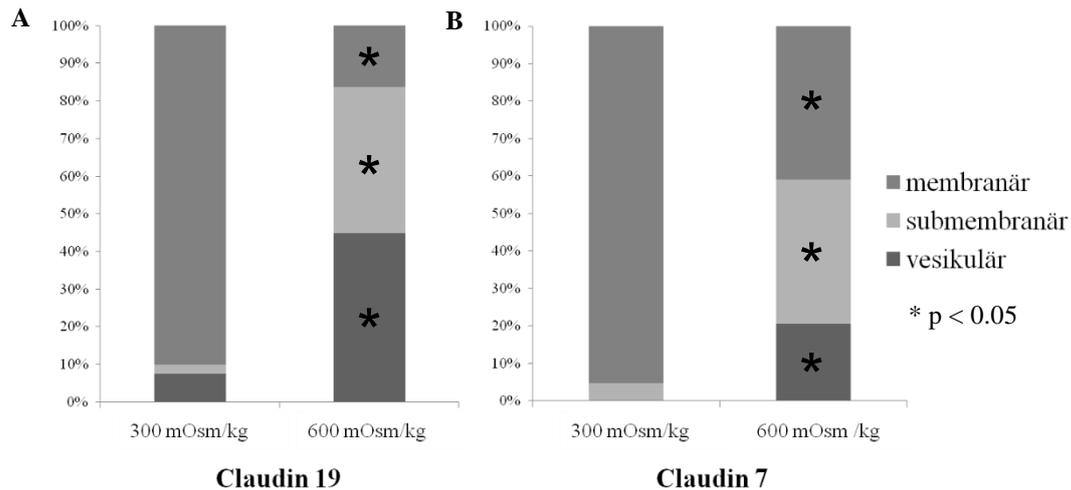


Abbildung 25: Expressionsmuster der Claudine bei unterschiedlichen Kulturbedingungen

Die beiden Balkendiagramme zeigen jeweils den prozentualen Anteil membranären, submembranären und vesikulären Claudinverteilungsmusters bei 300 und 600 mOsm/kg-Kulturbedingungen. (A) fasst hierbei jeweils alle Claudin 19 gefärbten Filter und (B) alle Claudin 7 gefärbten Filter zusammen. Signifikanz zwischen den jeweiligen Expressionsmustern ist hier auf Grunde der Komplexität nur durch * gekennzeichnet.

Bei Betrachtung der verschiedenen Filter unterschiedlicher Kulturbedingungen fiel zudem ein hoch signifikanter Unterschied in dem Vorhandensein von Zellen dünner Schleifen auf (Abbildung 26). Er überwog deutlich bei den 600 mOsm/kg kultivierten Filtern ohne Veränderung sonstiger Präparationsschritte oder Kulturbedingungen.

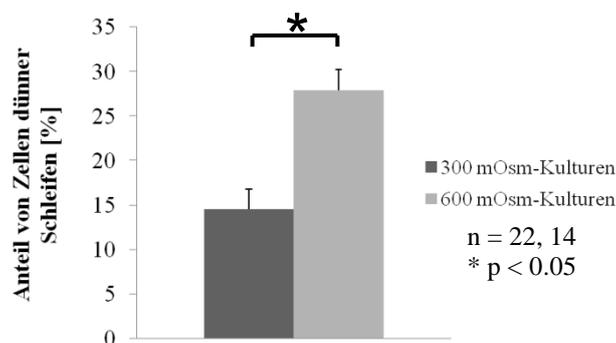


Abbildung 26: Anteil dünner Schleifen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen

Prozentualer Anteil der Zellen dünner Schleifen bei 600 und bei 300 mOsm /kg-Kulturbedingungen: Dieser ist bei 600 mOsm/kg fast doppelt so hoch wie unter 300 mOsm/kg.

3.1.2 Auswirkung von Aldosteron bei 300 mOsm/kg

3.1.2.1 Auswirkung von Aldosteron auf die elektrophysiologischen Parameter

Unter 300 mOsm/kg-Kulturbedingungen, ähnlich zu kortikalen Osmolalitätsverhältnissen bzw. unter simulierter Wasserdiurese, wurde der Einfluss des Na⁺-sparenden Hormons Aldosteron getestet. Die Kulturen unter 300 mOsm/kg wurden jeweils in die bereits beschriebenen zwei Gruppen positiver und negativer DPs eingeteilt und getrennt verglichen (Abbildung 27).

Der $\Delta I_{sc\ amil}$ ohne und mit Applikation von Aldosteron war nach Aldosteron-Applikation nur unwesentlich höher und dies nur bei der Gruppe mit positivem DP. Das Hormon hatte keinerlei Auswirkungen auf die Höhe der gemessenen DP als ein Maß für die parazelluläre Selektivität für Ionen.

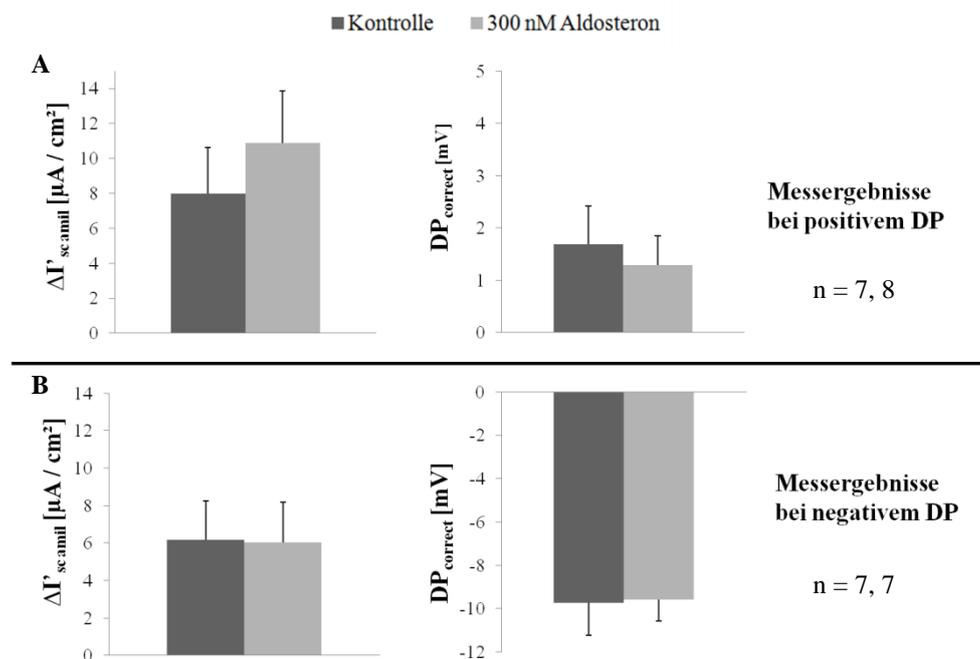


Abbildung 27: Elektrophysiologische Parameter mit und ohne Aldosteron-Applikation

Die Abbildung zeigt die Amilorid abhängigen I'_{sc} ($\Delta I'_{sc\ amil}$) und die Diffusionspotentiale bei Niedrig-NaCl-Lösung in der Gruppe mit positiven DP (A) und negativen DP (B).

3.1.2.2 Einfluss von Aldosteron auf das Claudinexpressionsmuster

Die Filter, die im Kulturmedium 300 nM Aldosteron ausgesetzt worden waren, unterschieden sich in der Claudinexpression nicht von jenen, die nur von Kulturmedium umgeben waren (Abbildung 28).

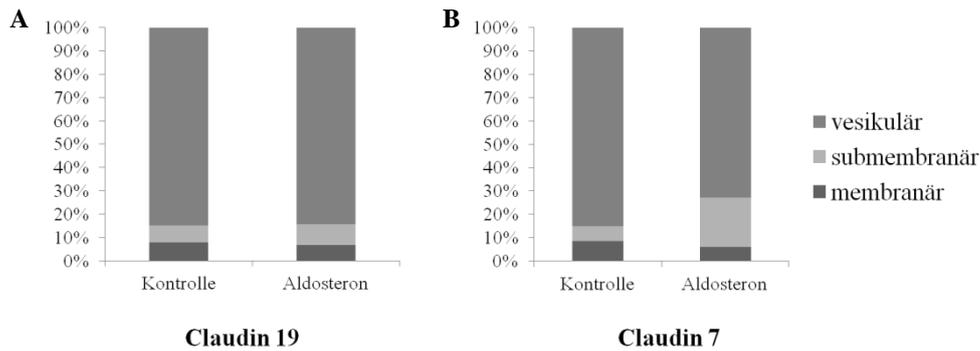


Abbildung 28: Einfluss von Aldosteron auf das Claudinexpressionsmuster

Die beiden Säulendiagramme zeigen jeweils den prozentualen Anteil des membranären, submembranären und vesikulären Claudinverteilungsmusters bei 300 mOsm/kg-Kulturbedingungen ohne Zusatz von Aldosteron (Kontrolle) und mit Zusatz von Aldosteron. (A) fasst hierbei jeweils alle Claudin 19 gefärbten Filter und (B) alle Claudin 7 gefärbten Filter zusammen. Es gab keine signifikanten Unterschiede.

3.1.3 Auswirkung von AVP auf IMCD-Kulturen

3.1.3.1 Immunfluoreszenznachweis von AQP2

Zunächst wurden die IMCD-Kulturen auf das Vorhandensein von AVP-Rezeptoren (V_2R) sowie von AQP2 überprüft (Abbildung 29). Hierfür wurden die Zellen mit 10 nM AVP im basolateralen Kulturmedium für 24 h inkubiert. In der Immunfluoreszenz konnte ein deutlicher Unterschied in der Expression von AQP2 nachgewiesen werden, d.h. nach AVP-Behandlung zeigte sich die AQP2-Färbung membranär, ohne die Behandlung hauptsächlich vesikulär.

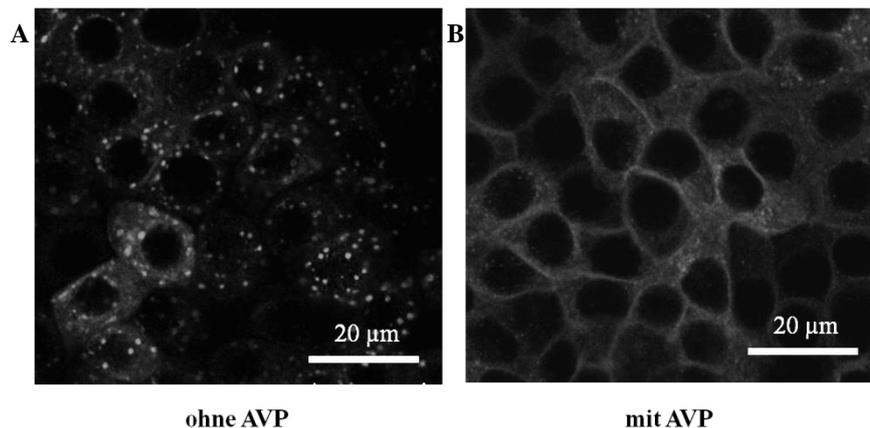


Abbildung 29: Nachweis der AVP-Wirkung

(A) zeigt einen unbehandelten Filterausschnitt mit deutlichen AQP2-positiven intrazellulären Vesikeln, während in (B) ein Filterausschnitt nach 24h-Inkubation mit 10 nM AVP und klarer Membranfärbung durch den AQP2-Antikörper dargestellt ist.

3.1.3.2 Auswirkung bei 300 mOsm/kg

3.1.3.2.1 Auswirkung von AVP auf die elektrophysiologischen Eigenschaften

Zunächst soll die Gruppe der Filter mit positiven DPs betrachtet werden. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied im DP nach Applikation von 10 nM AVP. Dieses wurde lumenpositiver (Abbildung 30).

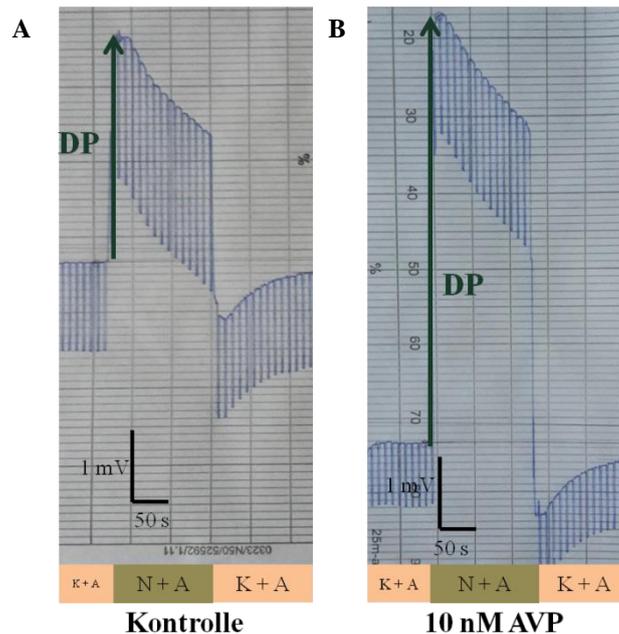


Abbildung 30: Originalaufzeichnungen zur Wirkung von AVP auf das DP

(A) zeigt ein DP unter Kontrollbedingungen bei 300 mOsm/kg und (B) den Einfluss von AVP auf dieses.

Die elektrophysiologischen Parameter sind in Abbildung 31 zusammengefasst.

Der Widerstand sowie V_{te} , I'_{sc} und $\Delta I'_{sc \text{ amil}}$ (die letzten drei Parameter sind in Abbildung 31 nicht gezeigt) waren nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen. Das Diffusionspotential war unter AVP-Einfluss deutlich positiver. Insgesamt bestand bei dieser Gruppe von Filtern eine leichte Kationenselektivität (Abbildung 31, C). Die alleinigen Werte von P_{Na^+} und P_{Cl^-} hingegen zeigten keinen signifikanten Unterschied, wobei allerdings P_{Na^+} in den AVP beeinflussten Kulturen geringfügig höher war und P_{Cl^-} geringfügig niedriger, was im Verhältnis zueinander die Signifikanz in P_{Na^+}/Cl^- ausmachte. AVP führte also zu einer vermehrten Kationenselektivität.

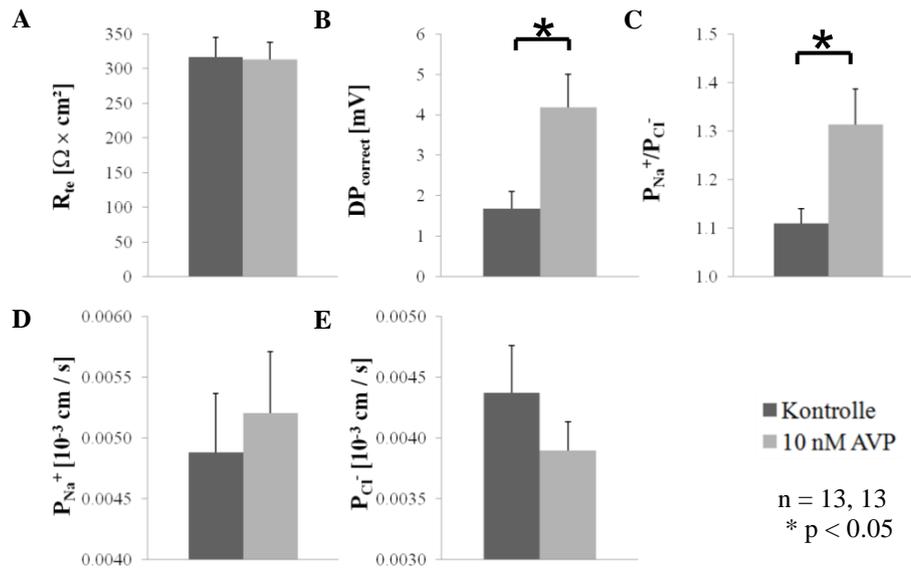


Abbildung 31: Einfluss von AVP auf die elektrophysiologischen Parameter

Dargestellt sind der transepitheliale Widerstand R_{te} (A), das um das LJP korrigierte Diffusionspotential $DP_{correct}$ (B), die Permeabilität von Na^+ über Cl^- $P_{\text{Na}^+/\text{Cl}^-}$ (C), die Natriumpermeabilität P_{Na^+} (D) und die Chloridpermeabilität P_{Cl^-} (E). Signifikante Unterschiede sind durch Stern und Klammer gekennzeichnet.

Wie in Kapitel 3.1.2 gab es auch in diesen Versuchstieren eine Gruppe von Kulturen mit primär negativem DP, die wieder getrennt betrachtet wurde.

Bei diesen Kulturen zeigte sich der gleiche Einfluss von AVP mit diesmal weniger lumennegativem Potential nach Hormongabe (Abbildung 32).

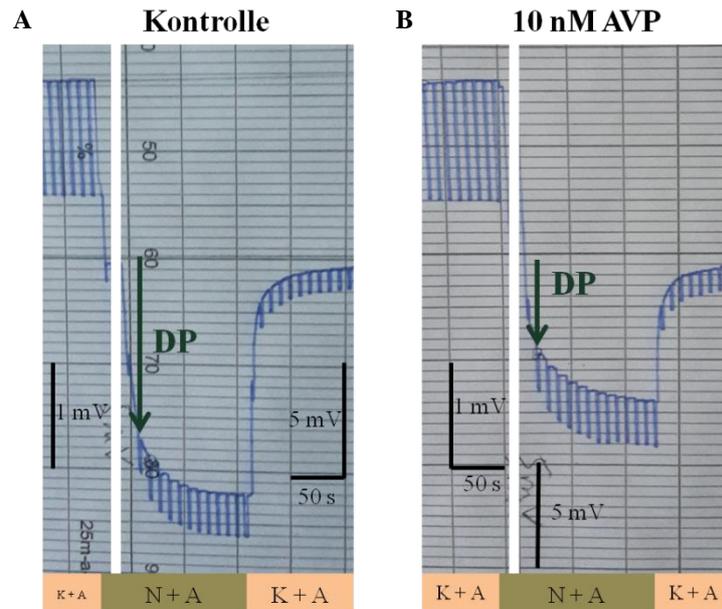


Abbildung 32: Originalaufzeichnungen des DP unter AVP-Einfluss

In (A) ist das DP ohne Hormoneinfluss dargestellt und in (B) eine Originalaufzeichnung eines Filters unter 300 mOsm/kg-Bedingungen nach Einfluss von AVP. Bei beiden Originalaufzeichnungen handelt es sich um Filter aus den Gruppen mit primär negativem DP. Zu beachten ist hier die unterschiedliche Skalierung vor und zu Beginn der DP-Messung. Der Ursprung des Pfeils ist der neue Bezugspunkt, auf den das Potential unter Kontrollbedingungen zurückgeht.

Unter Einfluss von AVP wurde das DP deutlich weniger negativ (Abbildung 33, B), d.h. die bestehende leichte Anionenselektivität (dargestellt als P_{Cl^-/Na^+}) sank (Abbildung 33, C). Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in R_{te} , P_{Na^+} und P_{Cl^-} (Abbildung 33, A, D und E), wobei der R_{te} jedoch niedriger war als in der zuvor beschriebenen Gruppe mit positiven DPs.

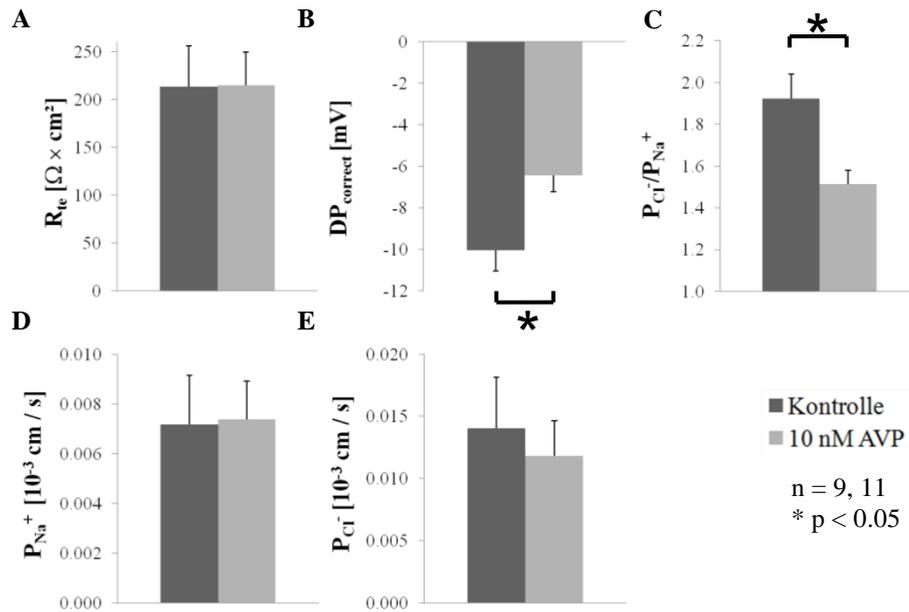


Abbildung 33: Einfluss von AVP auf die elektrophysiologischen Parameter

Dargestellt sind der transepitheliale Widerstand R_{te} (A), das um das LJP korrigierte Diffusionspotential $DP_{correct}$ (B), die Permeabilität von Cl^- über Na^+ P_{Cl^-/Na^+} (C), die Natriumpermeabilität P_{Na^+} (D) und die Chloridpermeabilität P_{Cl^-} (E). Signifikante Unterschiede sind durch Stern und Klammer gekennzeichnet.

3.1.3.2.2 Unterschiede in der Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenzauswertung wurden die Kulturen mit positiven und negativen DP zusammen ausgewertet, da das Expressionsmuster hier nicht mit der Richtung des Diffusionspotentials korrelierte.

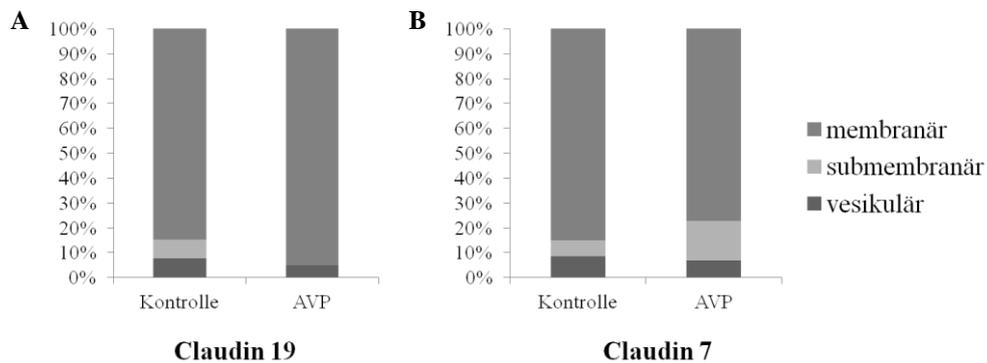


Abbildung 34: Claudinexpressionsmuster

(A) zeigt die prozentuale Verteilung der Claudinverteilungsmuster bei Claudin 19 gefärbten Filtern, (B) bei Claudin 7 gefärbten Filtern. Lediglich der submembranäre Anteil von Claudin 19 unter AVP nahm signifikant ab.

Die Auswertung der Expressionsmuster von Claudin 19 und 7 (Abbildung 34) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen AVP behandelten und unbehandelten Filtern mit Ausnahme der submembranären Verteilung von Claudin 19 unter AVP. Diese ist hier signifikant geringer ($p = 0,04$).

3.1.3.3 Auswirkung bei 600 mOsm/kg

3.1.3.3.1 Beeinflussung der Elektrophysiologischen Parameter durch AVP

Nach Applikation von AVP unter 600 mOsm/kg-Bedingungen zeigten sich vor allem Veränderungen in den tranzellulären Eigenschaften und im Natriumtransport.

Ein deutlich höherer Widerstand (Abbildung 35, über ΔV_{te} in orange berechnet) und der deutlich geringere Transport transepithelial (Abbildung 35, $\Delta I'_{sc}$ -Unterschied über Potentialänderung sichtbar in grün) unter AVP-Einfluss ließen sich schon während der Ussing-Kammer-Messungen auf dem Schreiberpapier beobachten (Abbildung 35).

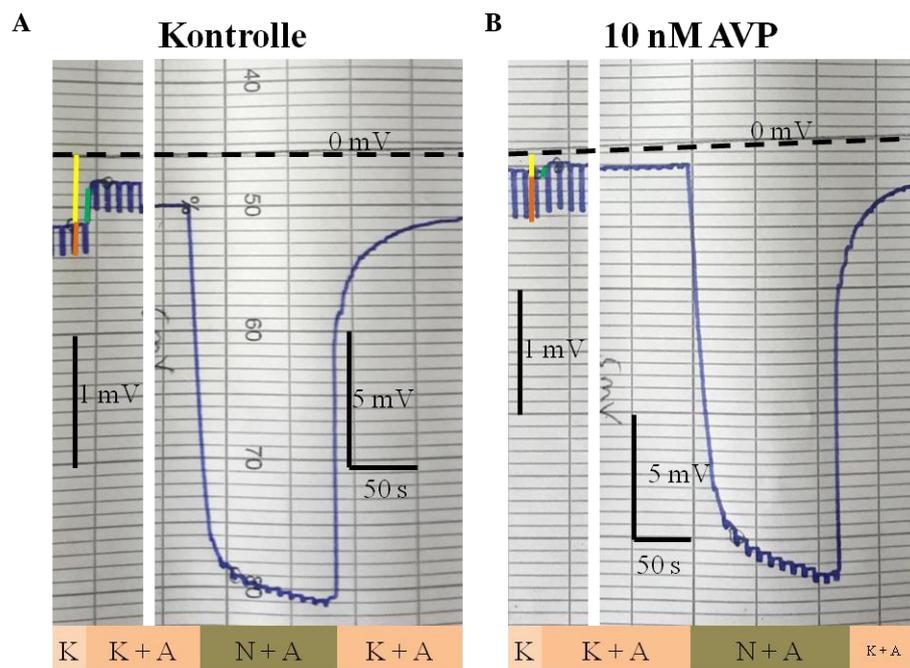


Abbildung 35: Originalaufzeichnung des AVP-Einflusses

Grafik (A) zeigt die Aufzeichnung bei einem Filter, das unter 600 mOsm/kg ohne Hormoneinfluss kultiviert wurde. Grafik (B) zeigt im Vergleich dazu den Einfluss des Hormons AVP auf ΔV_{te} (orange Linie), das transepitheliale Potential V_{te} (gelbe Linie) und den durch Amilorid hemmbaren Anteil von V_{te} (grüne Linie).

Abbildung 36 fasst die elektrophysiologisch gemessenen Parameter zusammen. V_{te} wurde weniger negativ, beide Werte unterschieden sich signifikant von Null. R_{te} stieg an. Durch den

fast doppelt erhöhten Widerstand unter AVP, bei gleichzeitiger Verringerung von V_{te} , nahm der I'_{sc} , und dementsprechend auch $\Delta I'_{sc\ amil}$ stark ab. Das DP war unter beiden Bedingungen vergleichbar und es bestand in beiden Fällen Anionenselektivität, dargestellt als P_{Cl^-/Na^+} . Die Betrachtung der Permeabilitäten für die Ionen zeigt einen signifikanten Unterschied. P_{Na^+} und P_{Cl^-} sanken beide ab (Abbildung 36).

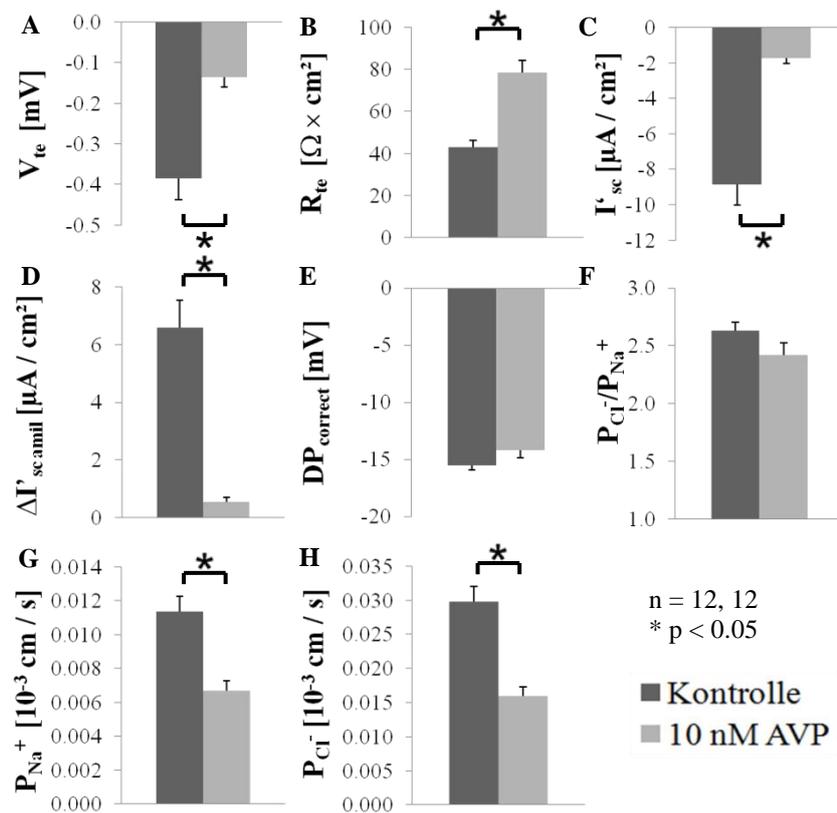


Abbildung 36: Einfluss von AVP auf die elektrophysiologischen Parameter

Dargestellt sind das transepitheliale Potential V_{te} (A), der transepitheliale Widerstand R_{te} (B), der berechnete Kurzschlussstrom I'_{sc} (C), der durch Amilorid hemmbare Kurzschlussstrom $\Delta I'_{sc\ amil}$ (D), das um das LJP korrigierte Diffusionspotential $DP_{correct}$ (E), die Permeabilität von Cl^- über Na^+ P_{Cl^-/Na^+} (F), die Natriumpermeabilität P_{Na^+} (G) und die Chloridpermeabilität P_{Cl^-} (H). Signifikante Unterschiede sind durch Stern und Klammer gekennzeichnet.

3.1.3.3.2 Unterschiede in der Immunfluoreszenz

In der Immunfluoreszenz zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Verteilungsmuster von Claudin 19 und Claudin 7 (Abbildung 37).

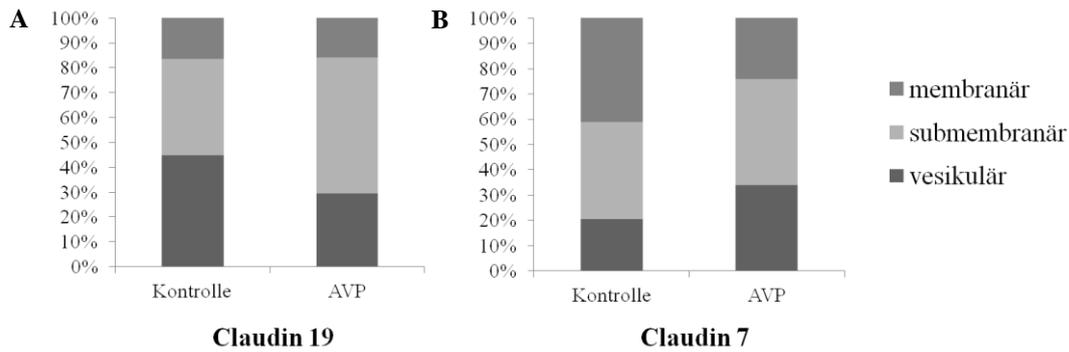


Abbildung 37: Einfluss von AVP auf das Claudinexpressionsmuster

(A) zeigt die prozentuale Verteilung von Claudin 19 bei Kontrollbedingungen unter 600 mOsm/kg ohne Hormoneinfluss und bei Einfluss von AVP. (B) zeigt diese prozentuale Verteilung im Vergleich der beiden Kulturbedingungen für Claudin 7.

Allerdings konnte ein hoch signifikanter Unterschied ($p = 0,0004$) in dem Vorhandensein von Zellen dünner Schleifen beobachtet werden. Nach Behandlung mit AVP sank dieser von vorher $28 \pm 2\%$ auf $10 \pm 3\%$ (Abbildung 38).

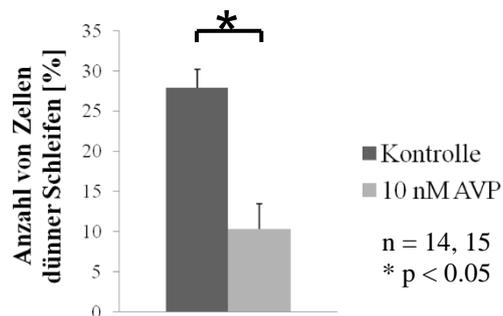


Abbildung 38: Einfluss von AVP auf die Anwesenheit von Zellen dünner Schleifen in der Kultur

Prozentualer Anteil der Zellen dünner Schleifen unter Einfluss von AVP und ohne bei 600 mOsm/kg-Kulturbedingungen: Der Anteil der dünnen Schleifen sinkt fast bis auf das Niveau unter 300 mOsm/kg-Kulturbedingungen (vgl. Abbildung 26).

3.1.4 Auswirkung von Cyclosporin A

3.1.4.1 Einfluss von Cyclosporin A auf die elektrophysiologischen Parameter

Bei der Applikation von CsA unter 600 mOsm/kg-Bedingungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der geringeren Konzentration von 50 ng/ml, dafür aber bei 5 $\mu\text{g/ml}$. Die Veränderung des DP war schon während der Versuchsdurchführung zu sehen (Abbildung 39).

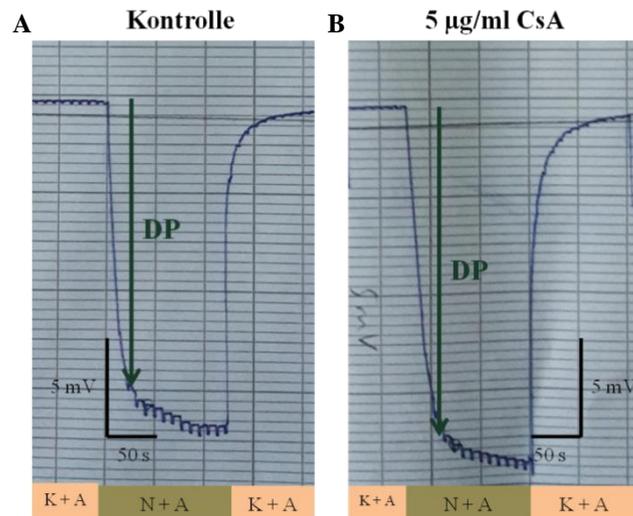


Abbildung 39: Einfluss von CsA auf das DP

Originalaufzeichnungen der Messung des DP bei einem Filter, der mit CsA (B) und ohne Inkubation (A) behandelt wurde: Das DP wurde durch CsA negativer.

Bei Messung der elektrophysiologischen Parameter (Abbildung 40) wurde V_{te} weniger negativ, wobei beide Werte sich signifikant von Null unterschieden. R_{te} unterschied sich nicht wesentlich von den Kontrollkulturen. Der I'_{sc} hingegen wurde weniger negativ. Aus diesem Grund war auch der $\Delta I'_{sc\ amil}$ signifikant geringer.

Das DP unter $5\ \mu\text{g/ml}$ CsA wurde um einiges negativer und P_{Cl^-/Na^+} anionenselektiver.

Unter $50\ \text{ng/ml}$ CsA zeigte sich bei V_{te} , I'_{sc} und $\Delta I'_{sc\ amil}$ die gleiche Tendenz wie unter $5\ \mu\text{g/ml}$. Die anderen elektrophysiologischen Parameter ließen keinen Zusammenhang zwischen Konzentration und Höhe des Einflusses erkennen.

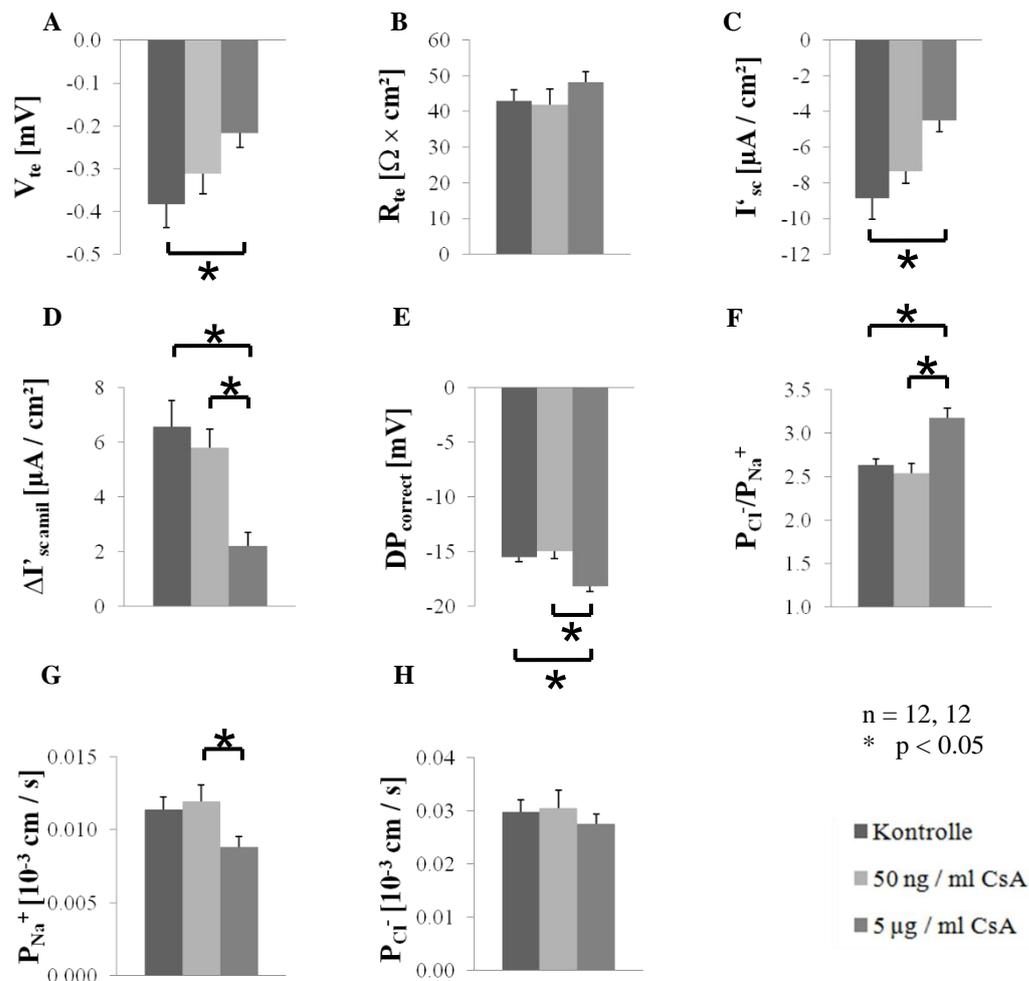


Abbildung 40: Einfluss von CsA auf die elektrophysiologischen Parameter

Das transepitheliale Potential V_{te} (A), der transepitheliale Widerstand R_{te} (B), der berechnete equivalente Kurzschlussstrom I'_{sc} (C), der durch Amilorid hemmbare Kurzschlussstrom $\Delta I'_{sc \text{ amil}}$ (D), das um das LJP korrigierte Diffusionspotential $DP_{correct}$ (E), die Permeabilität von Cl^- über Na^+ P_{Cl^-}/P_{Na^+} (F), die Natriumpermeabilität P_{Na^+} (G) und die Chloridpermeabilität P_{Cl^-} (H) sind dargestellt. Signifikante Unterschiede sind durch Stern und Klammer gekennzeichnet.

3.1.4.2 Unterschiede in der Immunfluoreszenz

Bei der Claudin 7-Färbung zeigte sich in der Immunfluoreszenz kein Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen (Abbildung 41).

Die Claudin 19-Expressionsmuster wurden allerdings von 5 µg/ml CsA signifikant verändert (Abbildung 41). Es zeigte sich ein zunehmend membranäres Expressionsmuster gegenüber 50 ng/ml CsA auf Kosten der vesikulären Verteilung. Auch gegenüber der Kontrolle war der vesikuläre Anteil von Claudin 19 erniedrigt und der membranäre erhöht. Unter 50 ng/ml CsA gab es keine signifikanten Unterschiede in Bezug zur Kontrollgruppe (Abbildung 41 und Abbildung 42).

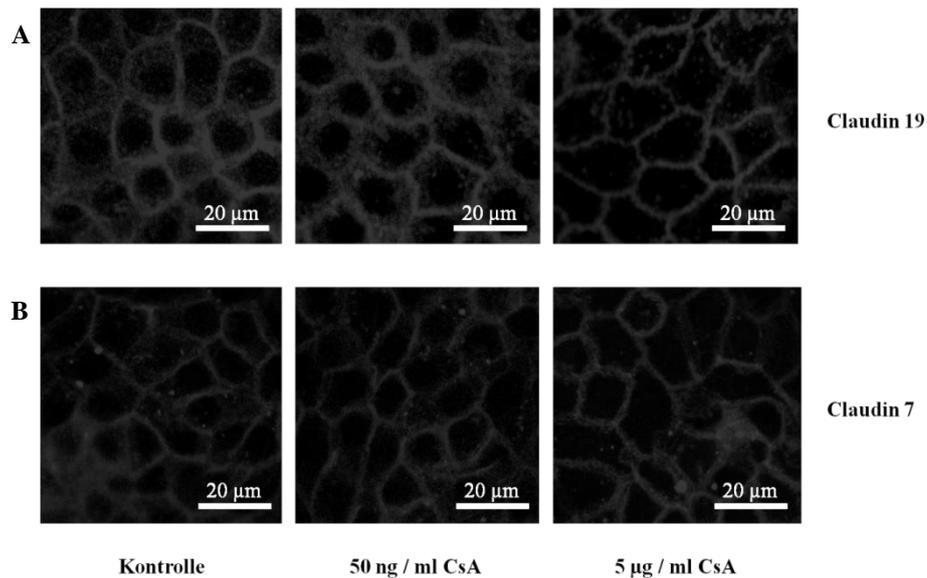


Abbildung 41: CsA-Einfluss auf das Claudinexpressionsmuster

In Reihe (A) sind die Claudin 19 gefärbten Filter in der Reihenfolge Kontrolle, 50 ng/ml CsA und 5 µg/ml CsA dargestellt, in Reihe (B) Claudin 7 gefärbte Filter der verschiedenen Kulturbedingungen.

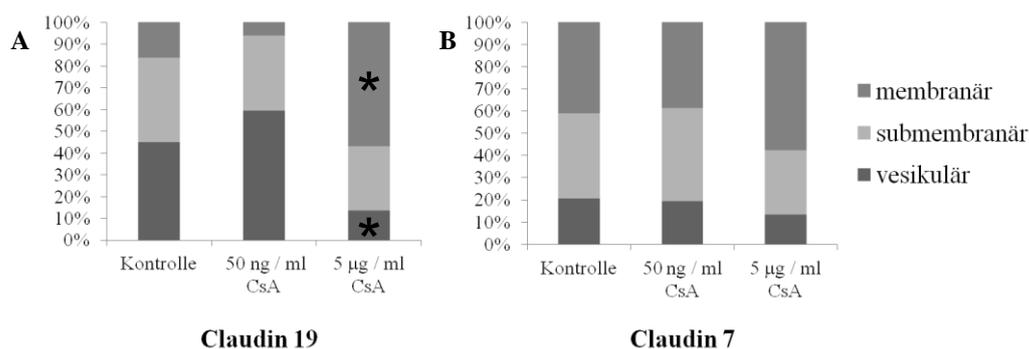


Abbildung 42: Einfluss von CsA auf das Claudinexpressionsmuster

(A) zeigt die prozentuale Verteilung des membranären, submembranären und vesikulären Verteilungsmuster von Claudin 19 unter Kontrollbedingungen bei 600 mOsm/kg und unter Einfluss von 50 ng/ml CsA sowie 5 µg/ml CsA. In (B) ist diese prozentuale Verteilung für Claudin 7 gefärbte Filter dargestellt. Sternchen markiert Signifikanz, wobei in diesem Falle der vesikuläre und membranäre Anteil von Claudin 19 unter 5 µg/ml CsA zu beiden anderen Versuchsgruppen signifikant war.

Abschließend wurde der Anteil der Zellen dünner Schleifen unter CsA-Einfluss untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass dieser unter der Behandlung mit 50 ng/ml zunahm, während die höhere Konzentration von CsA keinen Einfluss hatte (Abbildung 43).

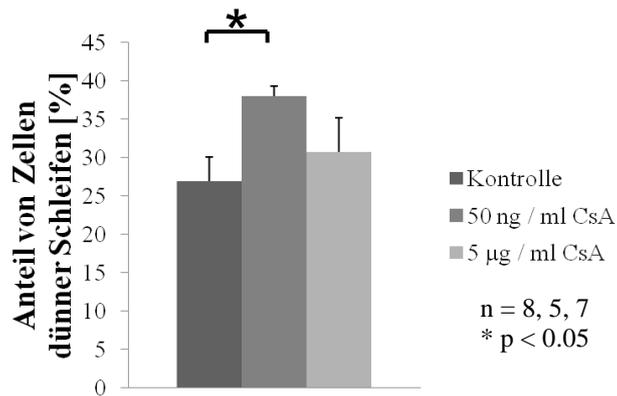


Abbildung 43: Anteil von Zellen dünner Schleifen unter CsA-Einfluss

Gezeigt ist der prozentuale Anteil an Zellen von dünnen Schleifen auf den Filtern mit und ohne Einfluss verschiedener CsA-Konzentrationen. Klammer und Stern zeigt Signifikanz.

3.2 Auswirkung unterschiedlicher medullärer Osmolalitäten *in vivo* auf die Tubulusfunktion

Im Tierversuch wurden bei Ratten durch Vorbehandlung unterschiedliche osmotische Zustände des Nierenmarks erzeugt. Danach wurde *ex vivo* untersucht, welchen Einfluss diese Vorbehandlung auf die Eigenschaften der Tubulusepithelien hatte.

3.2.1 Metabolische Parameter bei unterschiedlicher Diurese

Die Wirkung der Vorbehandlung wurde *in vivo* auf metabolischen Käfigen gemessen (Abbildung 44). Raumklima, Luftfeuchtigkeit, Tiergewicht und aufgenommene Futtermenge wurden für alle drei Versuchsgruppen konstant gehalten. Die Trinkmenge und die Urinmenge waren bei der Furosemidgruppe und unter Wasserbelastung deutlich erhöht. Die Urinkonzentration war entsprechend erniedrigt: 2148 ± 164 mOsm/kg (Kontrollgruppe), 897 ± 42 mOsm/kg (Furosemidgruppe) und 357 ± 11 mOsm/kg (Wasserbelastungsgruppe). Die exzessive Wasseraufnahme der wasserbelasteten Tiere zeigte sich zusätzlich im Kotgewicht und im Wassergehalt des Kots. Da die Tiere nicht immer die gesamte Futtermenge fraßen, wichen die Trinkmenge und die Futtermenge von dem im Methodenteil berechneten Tagesbedarf ab.

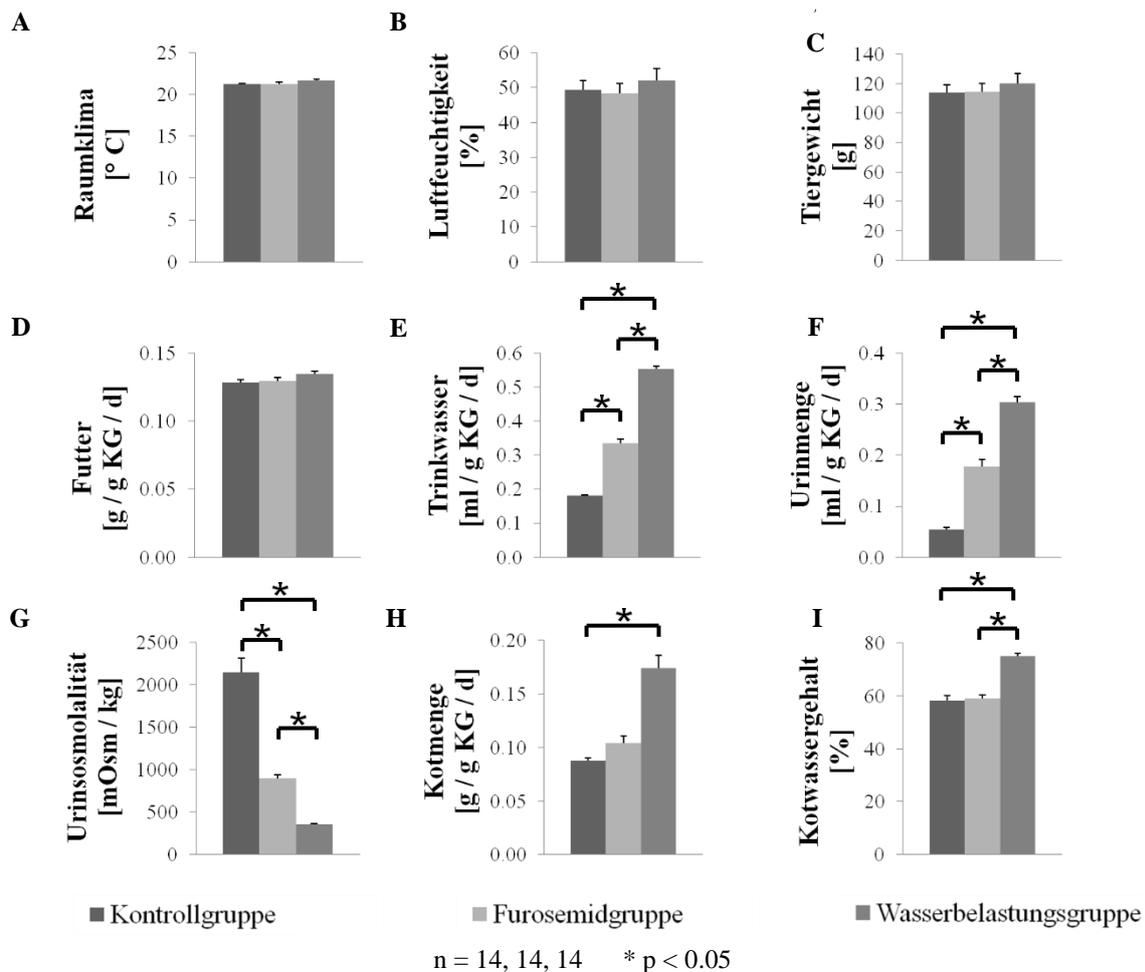


Abbildung 44: Metabolische Daten bei unterschiedlichen Diuresezuständen

Dargestellt sind die unterschiedlichen metabolischen Parameter, die während und nach Behandlung der Versuchstiere auf den Stoffwechselkäfigen erhoben worden sind. (A) zeigt das Raumklima, (B) die Luftfeuchtigkeit, (C) das Tiergewicht, (D) die Futtermenge, (E) die Trinkwassermenge, (F) die Urinmenge, (G) die Urinosmolalität, (H) die Kotmenge und (I) das Kottrockengewicht. Klammer und Stern kennzeichnen Signifikanz.

3.2.2 Parazelluläre Transporteigenschaften bei unterschiedlicher Diurese

3.2.2.1 Dünne Schleifen

3.2.2.1.1 Absteigende dünne Schleifen

Bei der Perfusion der absteigenden dünnen Schleifen (dTL) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen elektrophysiologischen Parametern (Abbildung 45).

V_{te} war in allen drei Gruppen nicht signifikant von Null verschieden. Sowohl bei der Betrachtung von ΔV_{te} , dem Radius des dTL-Lumens, und R_{te} zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. R_{te} lag in den Gruppen durchschnittlich zwischen 14 und 16 $\Omega \times \text{cm}^2$. Der I'_{sc} war insgesamt sehr gering, unterschied sich aber nicht zwischen den Gruppen.

Das DP war ebenfalls niedrig und lag in den drei Gruppen durchschnittlich zwischen 0 und 1 mV, bei nur geringfügig höherer Anionenselektivität.

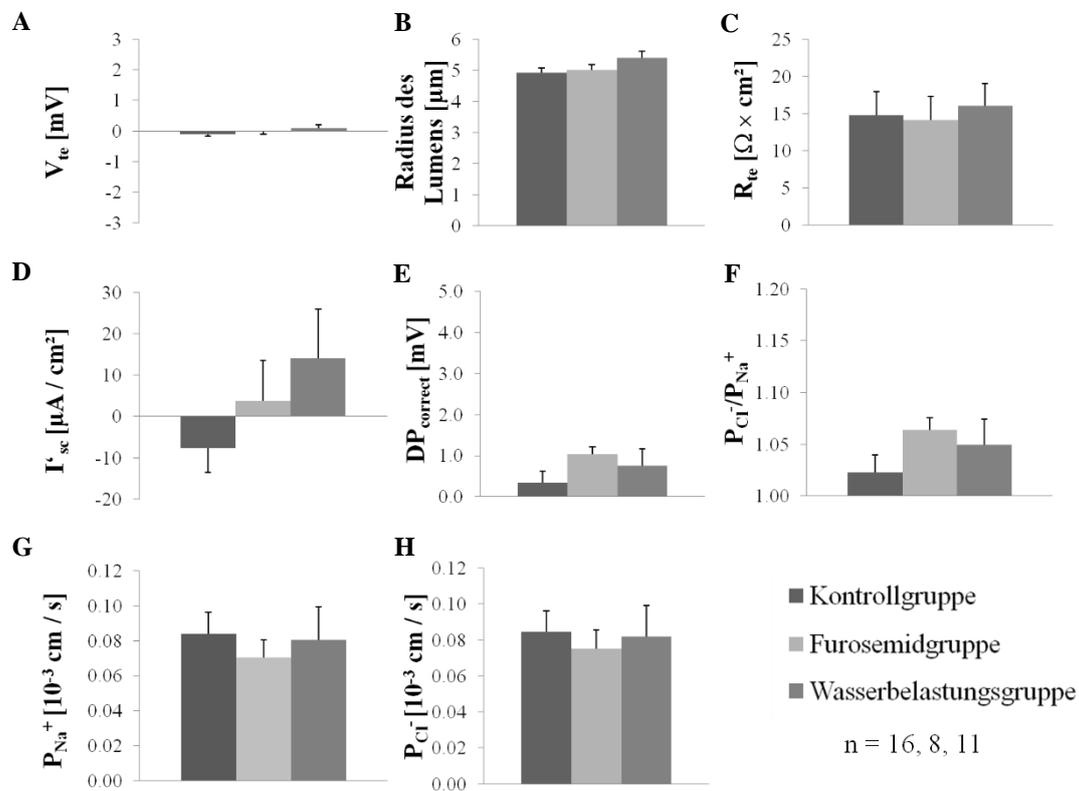


Abbildung 45: Elektrophysiologische Untersuchung der dTL

Die elektrophysiologischen Parameter der absteigenden dünnen Schleifen sind hier zusammengefasst. (A) zeigt das transepitheliale Potential bei unterschiedlichem Diuresezustand, (B) den Radius des Lumens, (C) den transepithelialen Widerstand, (D) den berechneten Kurzschlussstrom, (E) das um das LJP korrigierte Diffusionspotential, (F) die Permeabilität von Cl^- über Na^+ , (G) die Permeabilität von Na^+ und (H) die Permeabilität von Cl^- . Es gibt in all diesen physiologischen Parametern keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Um einen besseren Überblick über die Verteilung der DPs zu bekommen, wurden diese noch einmal nach Osmolalität sortiert aufgetragen (Abbildung 46).

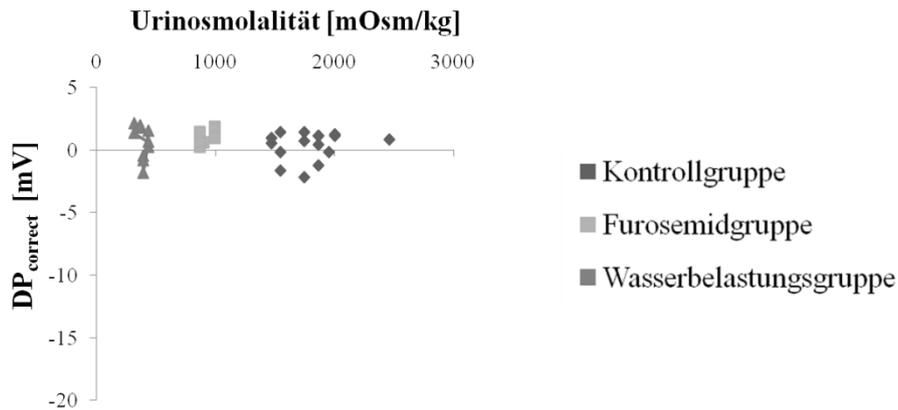


Abbildung 46: Diffusionspotentiale der dTL in Abhängigkeit der Urinosmolalität

Auf der y-Achse ist das um das LJP korrigierte Diffusionspotential aufgetragen und dem gegenübergestellt auf der x-Achse die Urinosmolalität. Für jede Ratte der drei Versuchsgruppen ist ein eigener Datenpunkt angegeben. Es zeigt keine Abhängigkeit zwischen DP und Urinosmolalität zwischen den Gruppen.

3.2.2.1.2 Aufsteigende dünne Schleifen

Bei der Auswertung der elektrophysiologischen Parameter zeigte sich ein signifikanter Unterschied im DP zwischen der Kontrollgruppe und der Wasserbelastungsgruppe (Abbildung 47). Die Kationenselektivität nahm unter Wasserbelastung zu.

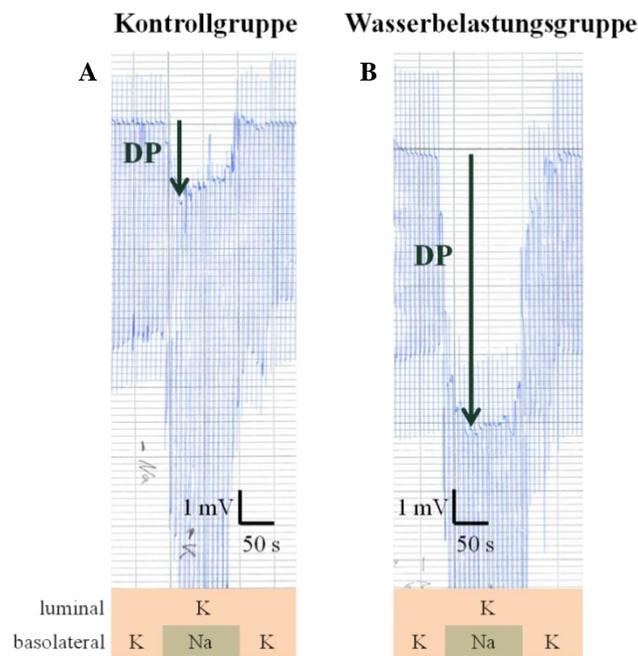


Abbildung 47: Originalaufzeichnung des DP der aTL

Die Aufzeichnung des Schreiberpapiers während der Perfusion eines Tubulus einer Ratte unter Kontrollbedingungen (A) und einer Ratte unter Wasserbelastung (B) zeigt den deutlichen Unterschied im DP.

Bei den weiteren elektrophysiologisch gemessenen Parametern (Abbildung 48) war V_{te} ähnlich zu dem der dTL und nur in der Kontrollgruppe signifikant von Null verschieden. Der Radius der aTL-Lumina und R_{te} waren mit den Werten der dTL vergleichbar. R_{te} lag hier im Durchschnitt in den drei Gruppen zwischen 14 und 15 $\Omega \times \text{cm}^2$. Im I'_{sc} war wie auch bei den dTL kein Unterschied zu erkennen.

Das DP zeigte die größten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Es wurde mit abnehmender Osmolalität negativer und damit kationenselektiver, während sich P_{Na^+} und P_{Cl^-} nicht unterschieden (Abbildung 48).

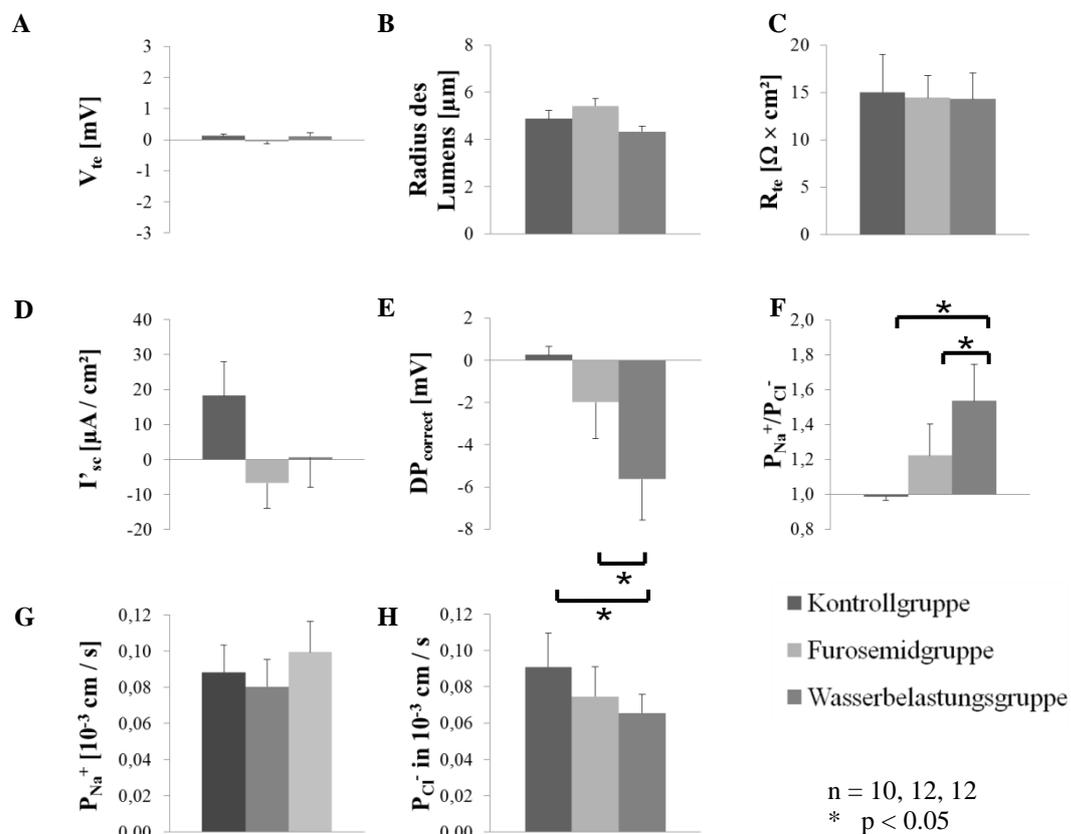


Abbildung 48: Elektrophysiologische Untersuchung der aTL

Die elektrophysiologischen Parameter der aufsteigenden dünnen Schleifen sind hier zusammengefasst. (A) zeigt das transepitheliale Potential bei unterschiedlichem Diuresezustand, (B) den Radius des Lumens, (C) den transepithelialen Widerstand, (D) den berechneten Kurzschlussstrom, (E) das um LJP korrigierte Diffusionspotential, (F) die Permeabilität von Na^+ über Cl^- , (G) die Permeabilität für Na^+ und (H) die Permeabilität für Cl^- . Klammer und Stern zeigen die Signifikanz an.

Die DP wurden wie zuvor bei den dTL in Abhängigkeit von der Osmolalität näher betrachtet und jedes DP der Urinosmolalität der jeweiligen Ratte zugeordnet. Es zeigte sich im Gegensatz zu den dTL eine deutliche Abhängigkeit. Bei hoher Osmolalität ging die Kationenselektivität

verloren (Abbildung 49).

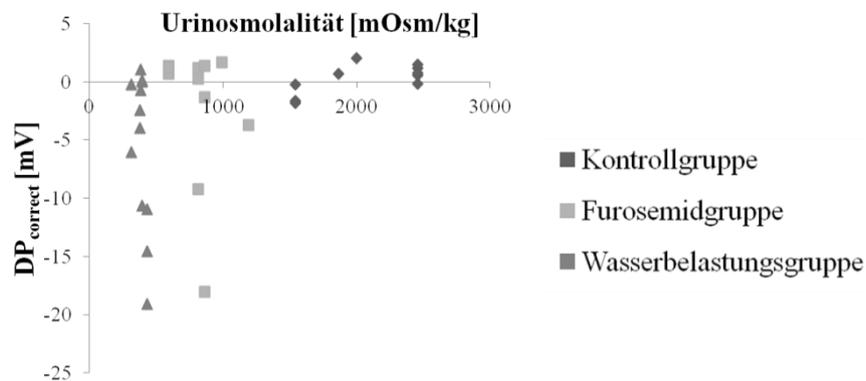


Abbildung 49: DP in Abhängigkeit der Urinosmolalität

Abhängigkeit des DP von der Urinosmolalität: Jede einzelne Ratte ist mit einem eigenen Datenpunkt gekennzeichnet.

3.2.3 Claudinexpressionsanalyse in den Nieren

3.2.3.1 Claudin 2-Expressionsmuster unter Versuch 1

Abbildung 50 zeigt die Expression von Claudin 2 im inneren Nierenmark unter den drei verschiedenen Behandlungen der Versuchstiere. In IMCD und IMaTL ist keine Färbung von Claudin 2 zu sehen. dTL-Abschnitte sind durch die gleichzeitige Expression von AQP1 charakterisiert (Abbildung 51). dTL zeigen im ISOM (nicht abgebildet) und kurz nach Beginn der inneren Medulla eine Claudinexpression wie durch die Kofärbung mit AQP 1 (Abbildung 51) gezeigt. Es konnte kein Übergang einer aTL in eine TAL gesehen werden, bei dem in der aTL eine Claudin 2-Expression zu sehen gewesen wäre. Claudin 2 wird also nur im oberen Abschnitt der dTL exprimiert und erscheint unter den drei verschiedenen Behandlungen gleich.

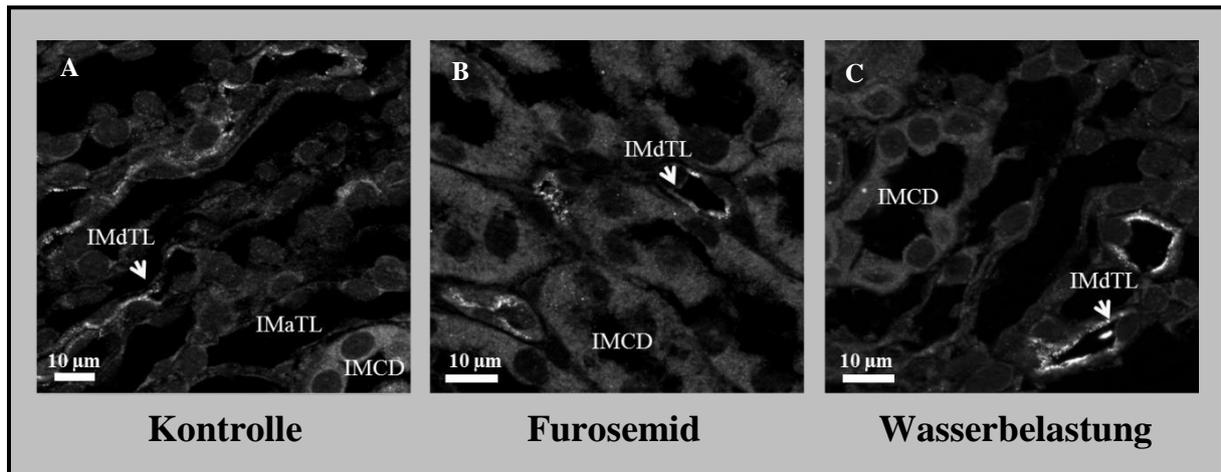


Abbildung 50: Claudin 2-Expression in der inneren Medulla

Alle drei Bilder zeigen einen Ausschnitt aus der inneren Medulla. Es ist Claudin 2 gefärbt. Bei (A) handelt es sich um ein Versuchstier unter Kontrollbedingungen, bei (B) unter Furosemidbehandlung und bei (C) unter Wasserbelastung. Die Pfeile markieren die jeweiligen Tubuli.

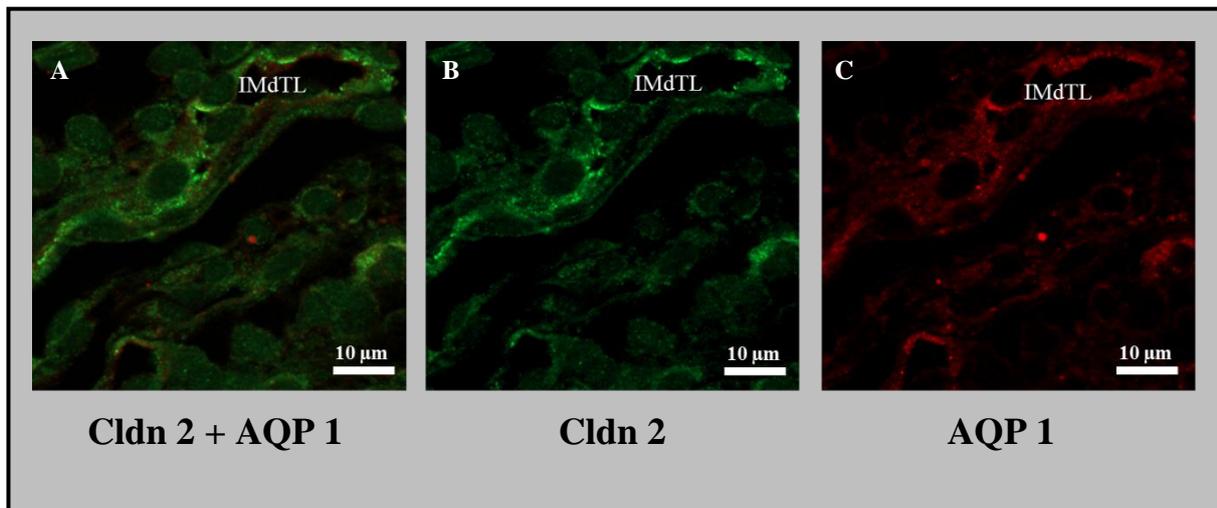


Abbildung 51: Claudin 2- AQP 1-Kofärbung einer Ratte unter Kontrollbedingungen

Alle drei Bilder zeigen den gleichen Ausschnitt aus der inneren Medulla unter Kontrollbedingungen. Bei (A) ist die Kofärbung von Claudin 2 (grün) und AQP 1 (rot) einer IMdTL zu sehen, bei (B) die alleinige Claudin 2-Färbung und bei (C) die AQP 1-Färbung. Dieser vergrößerte Ausschnitt zeigt, wie die Tubuli identifiziert wurden.

3.2.3.2 Claudin 4-Expressionsmuster

3.2.3.2.1 unter Versuch 1

Die Claudin 4-Färbung zeigt eine deutliche Expression im IMCD mit vermehrt strichförmiger lateraler Färbung bis zum Lumen und gut erkennbarer parazellulärer Abgrenzung sowie einigen basolateralen Vesikeln. Das Muster erscheint nahezu kastenförmig (Abbildung 53). IMTL zeigen ebenfalls die spezifische Färbung. Es sind sowohl Übergänge in TAL als auch die Expression im ISOM (Abbildung 52) zu sehen und Claudin 4 somit in aTL und dTL exprimiert.

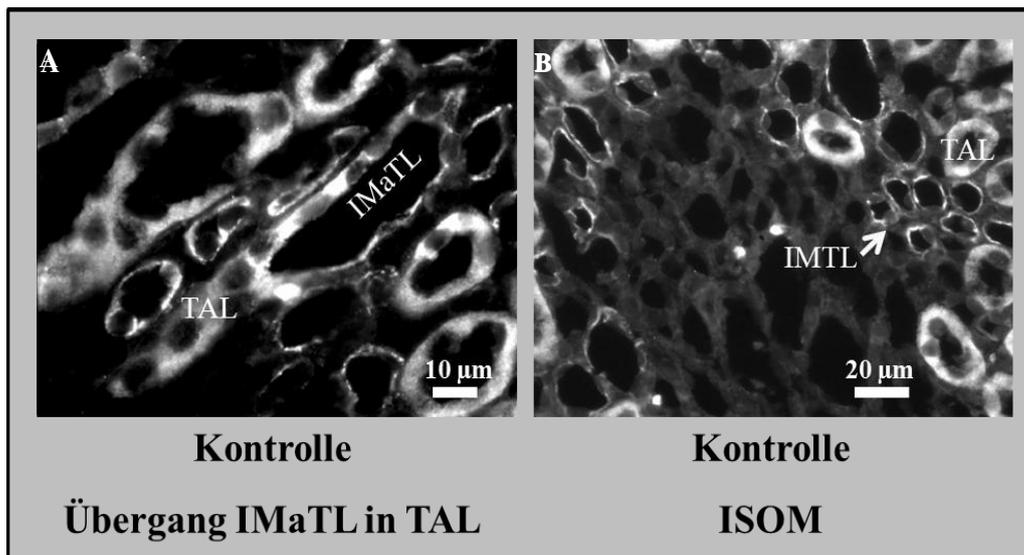


Abbildung 52: Übergang IMA TL in TAL und IMdTL im ISOM

(A) zeigt einen Übergang einer IMA TL in eine TAL am Übergang des IM in den ISOM. (B) zeigt einen Ausschnitt aus dem ISOM.

Das Muster in den IMTL erscheint linienförmig bis leicht mäandernd. Ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen ist nicht zu sehen (Abbildung 53).

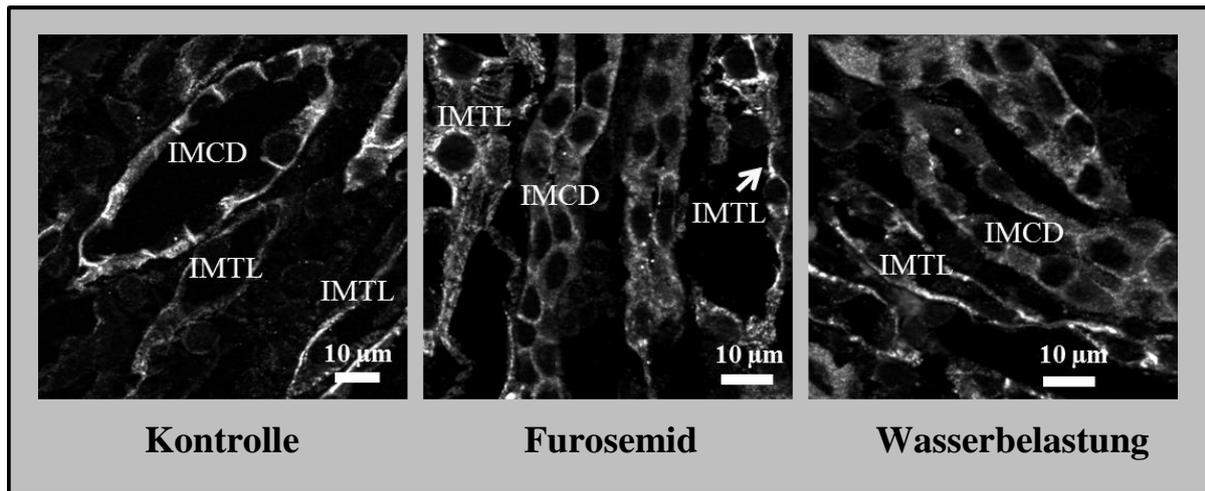


Abbildung 53: Claudin 4-Expression in der inneren Medulla

Alle drei Bilder zeigen einen Ausschnitt aus der inneren Medulla. Bei (A) handelt es sich um ein Versuchstier unter Kontrollbedingungen, bei (B) unter Furosemidbehandlung und bei (C) unter Wasserbelastung. Es ist Claudin 4 angefärbt. Ein Unterschied in der Claudin 4-Färbung konnte nicht gesehen werden.

3.2.3.2.2 unter Versuch 2

Es zeigt sich bei den Kontrolltieren und denen mit dDAVP und Furosemid extern vorbehandelten Versuchstieren die gleiche Kästchenform der Claudin 4-Expression im IMCD sowie die leicht mäandernde Form in den IMTL. Auch hier konnten die gleichen Kriterien wie bei den Färbungen der Tierversuchsratten aus Versuch 1 angewandt werden, die Claudin 4-Expression in IMA_{TL} und IMd_{TL} nahelegen. Es gab keinen Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen (Abbildung 54).

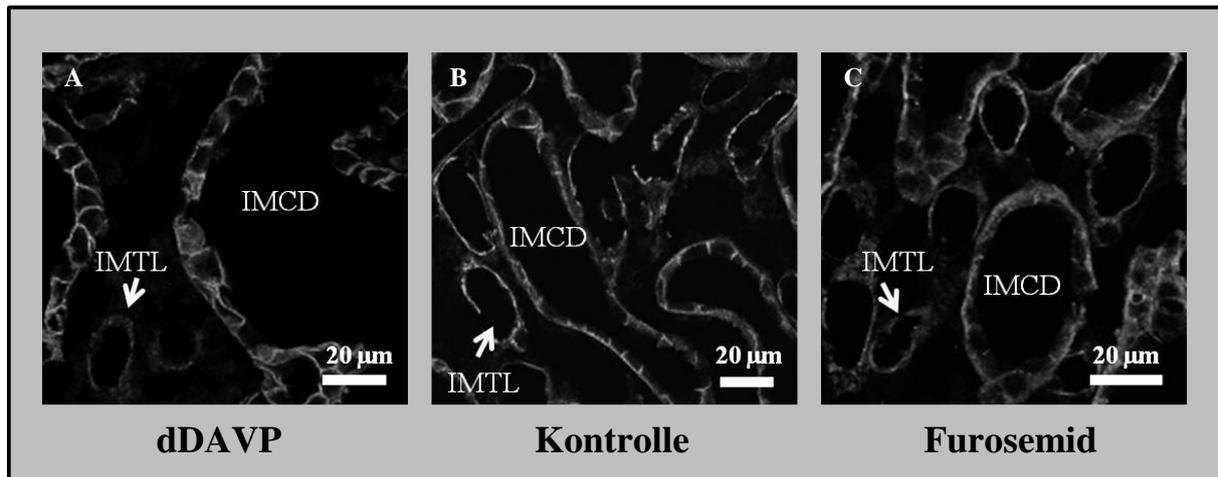


Abbildung 54: Claudin 4-Expression im IM vorbehandelter Tiere

Alle drei Bilder zeigen einen Ausschnitt aus der inneren Medulla unter Claudin 4-Anfärbung. Bei (A) handelt es sich um ein Versuchstier unter dDAVP-Einfluss, bei (B) unter Kontrollbedingungen und bei (C) unter Furosemidbehandlung. Die Pfeile markieren die jeweiligen Tubuli. Es gibt keine qualitativen Unterschiede des Claudin 4-Expressionsmusters in den Behandlungsgruppen.

3.2.3.3 Claudin 7-Expressionsmuster

3.2.3.3.1 unter Versuch 1

Es zeigte sich sowohl in IMCD und IMdTL eine Claudin 7-Expression (grün). IMdTL waren im oberen Teil AQP 1 (Abbildung 56) kogefärbt. Zusätzlich waren dTL im ISOM (Abbildung 57) gefärbt, Übergänge von IMaTL mit spezifischer Claudinfärbung in TAL waren nicht zu sehen. Da diese Übergänge gut zu finden sind, ist davon auszugehen, dass Claudin 7 nicht in aTL vorkommt. Die nur partiell vorhandene Ko-Färbung gegen AQP1 lässt sich durch die AQP1 Expression nur im oberen Teil der dTL erklären, während Claudin-7 den gesamten Verlauf der dTL exprimiert wird.

Im IMCD zeigte sich wieder das typische kästchenförmige Claudinmuster mit Claudin 7 strichförmig entlang der lateralen Zellkontakte. IMdTL zeigten eine leicht mäandernde teilweise umrahmende Färbung apikal.

Es gab keinen Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen (Abbildung 55).

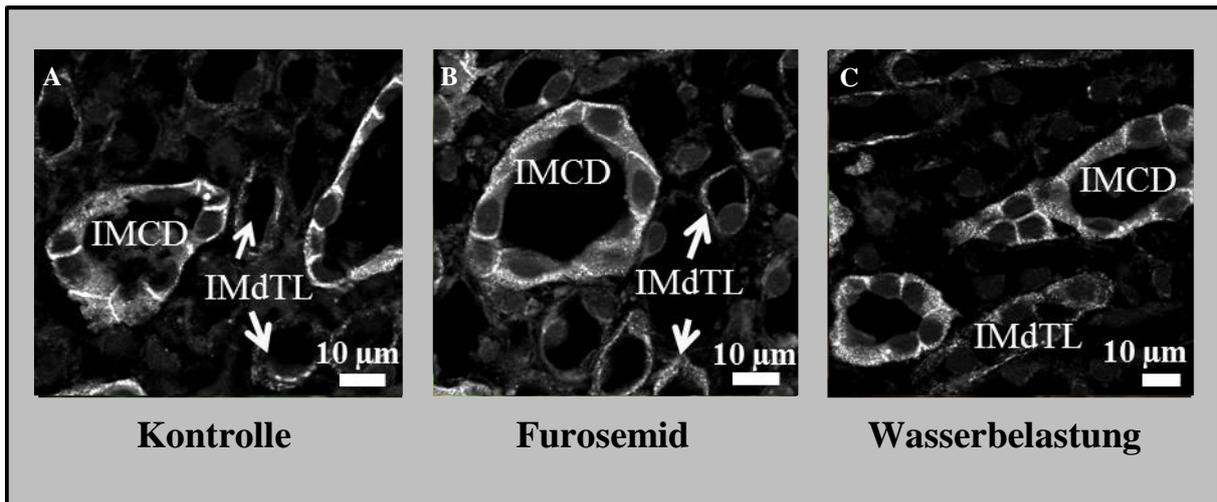


Abbildung 55: Claudin 7-Expression in der inneren Medulla

Alle drei Bilder zeigen einen Ausschnitt aus der inneren Medulla. Bei (A) handelt es sich um ein Versuchstier unter Kontrollbedingungen, bei (B) unter Furosemidbehandlung und bei (C) unter Wasserbelastung. Die Pfeile markieren die jeweiligen Tubuli. In weiß ist die Claudin 7-Färbung gezeigt. Es gibt keinen Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen.

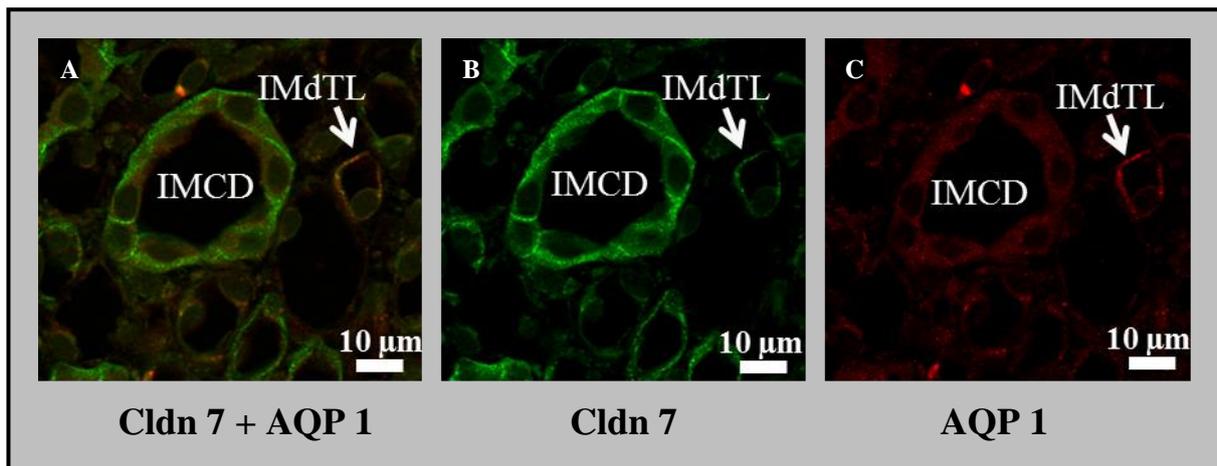


Abbildung 56: Claudin 7- AQP 1-Kofärbung in der inneren Medulla

Alle drei Bilder zeigen den gleichen mit Claudin 7 und AQP 1 kofärbten Ausschnitt aus der inneren Medulla bei Furosemidbehandlung. Bei (A) ist die Kofärbung, bei (B) die Claudin 7 und bei (C) die AQP 1-Färbung zu sehen. Die Pfeile markieren die jeweiligen Tubuli. In grün ist Claudin 7 gefärbt, in rot AQP1.

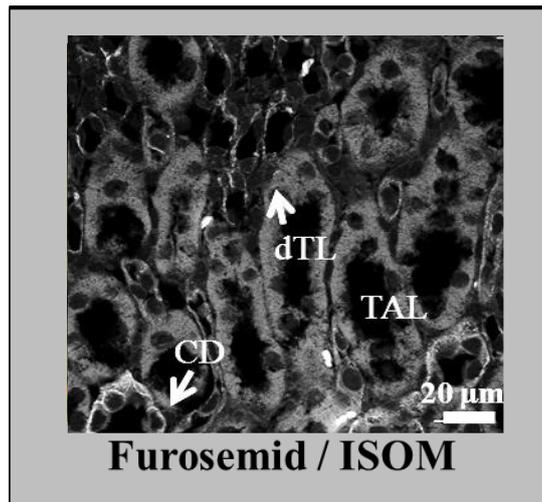


Abbildung 57: Claudin 7-Expression im ISOM

Ausschnitt aus dem ISOM einer furosemidbehandelten Ratte. Die spezifische Färbung zeigt Claudin 7.

3.2.3.3.2 unter Versuch 2

Die Claudin 7-Expression der vorbehandelten Versuchstiere unterschied sich nicht von der oben beschriebenen Expression der Tierversuchsratten (s. Kapitel 3.2.3.3.1): kästchenförmige Färbung im IMCD und im IMTL vermehrt randständige und gelegentlich leicht mäandernde spezifische Claudin 7-Färbung (Abbildung 58). Auch hier sind IMdTL und IMaTL nicht sicher unterscheidbar. Fehlende spezifische Färbung im Bereich der Übergänge von TAL zu den angrenzenden aTL lassen auch hier auf eine Claudinexpression beschränkt auf IMdTL schließen.

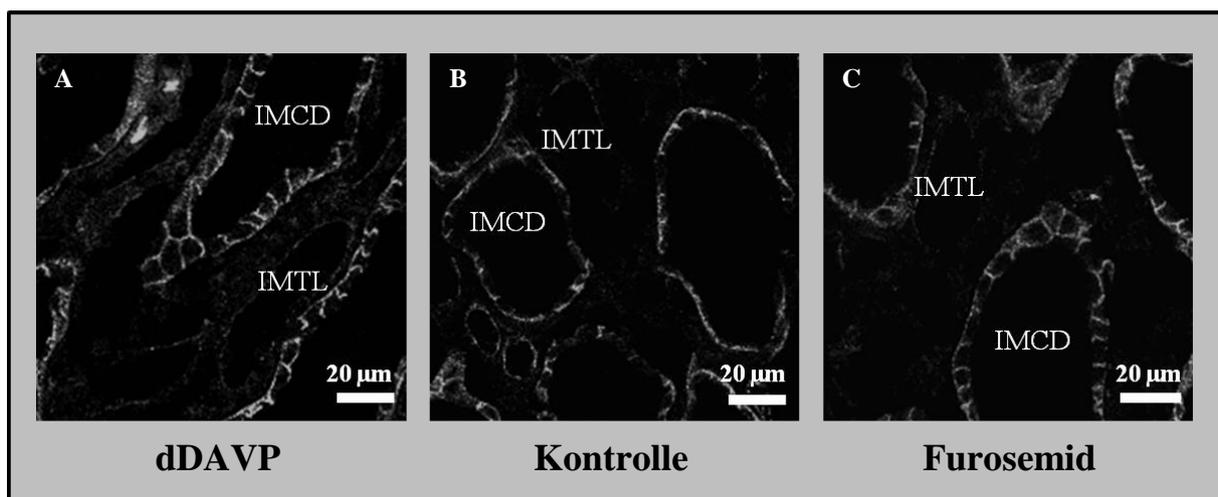


Abbildung 58: Claudin 7-Expression im IM vorbehandelter Tiere

Alle drei Bilder zeigen einen Ausschnitt aus der inneren Medulla. Bei (A) handelt es sich um ein Versuchstier unter dDAVP-Einfluss, bei (B) unter Kontrollbedingungen und bei (C) unter Furosemidbehandlung. Es handelt sich hierbei um eine Claudin 7-Färbung.

3.2.3.4 Claudin 10-Expressionsmuster

3.2.3.4.1 unter Versuch 1

Im IMCD war keine spezifische Färbung von Claudin 10 zu sehen.

Die Betrachtung der dünnen Schleifen zeigte keinen Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen. In allen drei Behandlungsgruppen waren im inneren Mark aTL mit gleichem stark ausgeprägten und deutlich mäandernden Färbungsmuster zu erkennen. Die Zuordnung dieses Musters zu den aTL fand erneut unter Beobachtung des Übergangs in die TAL statt. Ein Blick in den ISOM zeigte keine spezifische Färbung in den dTL.

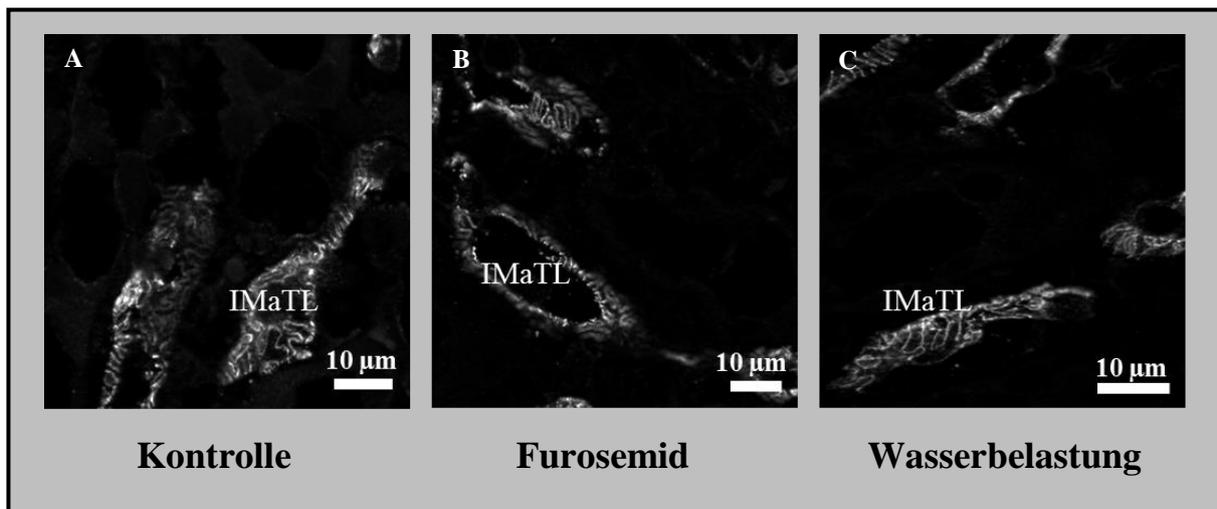


Abbildung 59: Claudin 10-Expression in der inneren Medulla

Alle drei Bilder zeigen einen Ausschnitt aus der inneren Medulla. Bei (A) handelt es sich um ein Versuchstier unter Kontrollbedingungen, bei (B) unter Furosemidbehandlung und bei (C) unter Wasserbelastung. Zu sehen sind die mit Claudin 10 gefärbten aTL.

3.2.3.4.2 unter Versuch 2

Claudin 10 wurde bei den vorbehandelten Versuchstieren mit Claudin 16 kofärbt (Abbildung 60). In allen drei Versuchsgruppen konnte weder eine spezifische Färbung von Claudin 10 im IMCD noch in IMdTL gefunden werden. IMaTL waren hingegen auch bei den Nierenschnitten dieser Tiere deutlich gefärbt mit stark mäanderndem Muster (Abbildung 61). Auf die Claudin 16 Färbung wird in Kapitel 3.2.3.5.2 eingegangen.

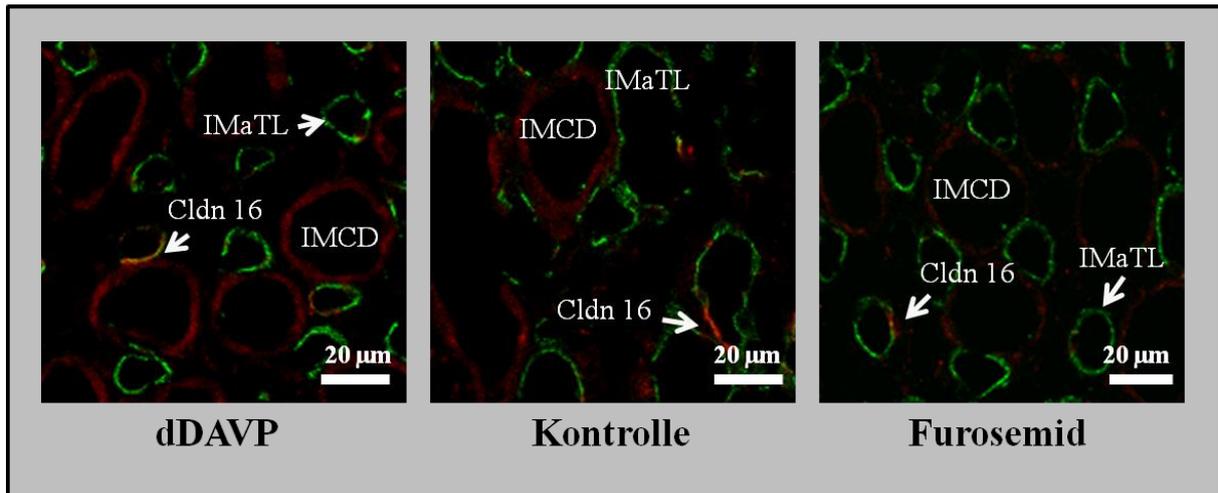


Abbildung 60: Claudin 10- und Claudin 16-Expression im IM vorbehandelter Tiere

Alle drei Bilder zeigen einen Ausschnitt aus der inneren Medulla. Bei (A) handelt es sich um ein Versuchstier unter dDAVP-Einfluss, bei (B) unter Kontrollbedingungen und bei (C) unter Furosemidbehandlung. In grün ist Claudin 10, in rot Claudin 16 gefärbt.

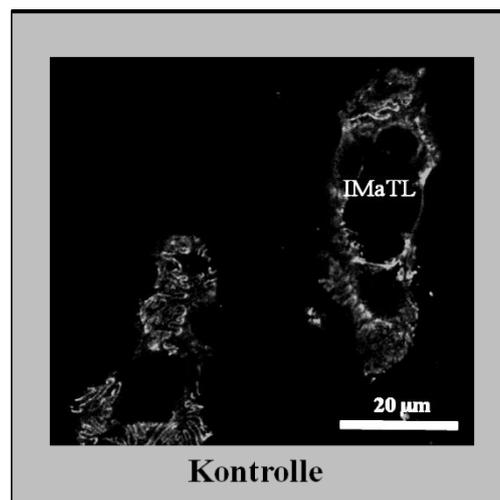


Abbildung 61: Claudin 10-Expressionsmuster in IMaTL

Der Bildausschnitt zeigt das mäandernde Claudin 10-Muster in IMaTL bei dem Nierenschnitt einer Ratte, die unter Kontrollbedingungen gehalten wurde.

3.2.3.5 Claudin 16-Expressionsmuster

3.2.3.5.1 unter Versuch 1

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin 16 ergab eine Färbung der IMaTL (Übergang in TAL war zu sehen; nicht abgebildet), die sich in keiner der

Behandlungsgruppen unterschied (Abbildung 62). Das Muster war linienförmig. Es konnte keine Kolo-kalisation von Claudin 16 und AQP 1 gefunden werden sowie keine Färbung von dTL im ISOM. Somit wird eine spezifische Färbung von Claudin 16 in IMdTL ausgeschlossen. IMCD zeigten keine Claudin 16-Expression.

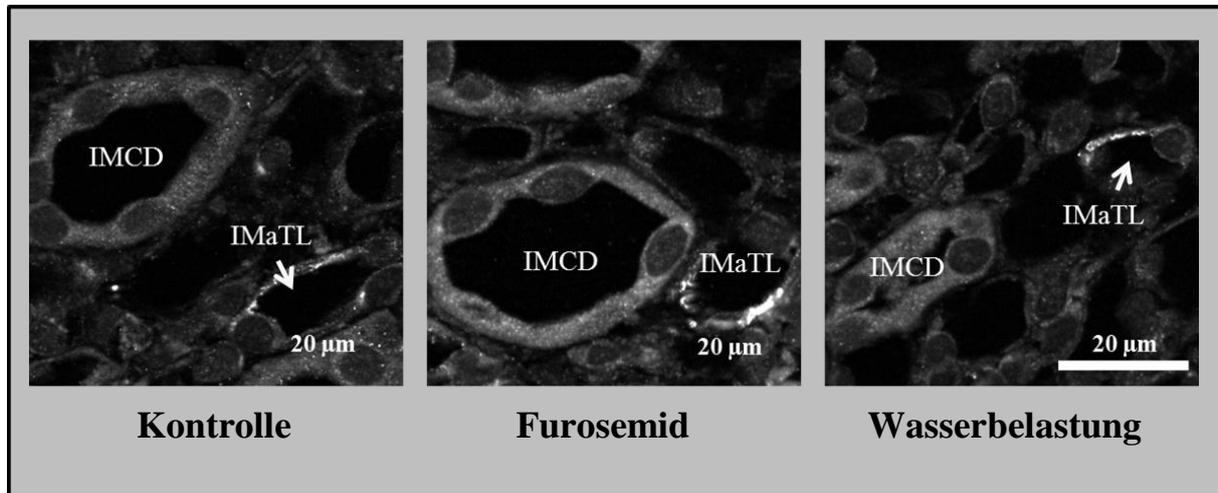


Abbildung 62: Claudin 16-Expression in der inneren Medulla

Alle drei Bilder zeigen einen Ausschnitt aus der inneren Medulla. Bei (A) handelt es sich um ein Versuchstier unter Kontrollbedingungen, bei (B) unter Furosemidbehandlung und bei (C) unter Wasserbelastung. Die Pfeile zeigen auf die jeweiligen Tubuli. Die spezifische Färbung in weiß zeigt Claudin 16.

3.2.3.5.2 unter Versuch 2

Die Claudin 16-Färbung (s. Kapitel 3.2.3.4.2) zeigt keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen: Es sind ebenfalls wie bei den Tierversuchsratten nur IMaTL mit linienförmigem Expressionsmuster gefärbt. Abbildung 63 zeigt eine IMaTL mit Claudin 10 (grün) und Claudin 16 (rot) als Beispiel für die Kofärbung der beiden Claudine in der IMaTL. Claudin 10 ist sowohl zusammen mit Claudin 16 in der Tight Junction lokalisiert (grün + rot = orange), als auch unabhängig von Claudin 16 (grün).

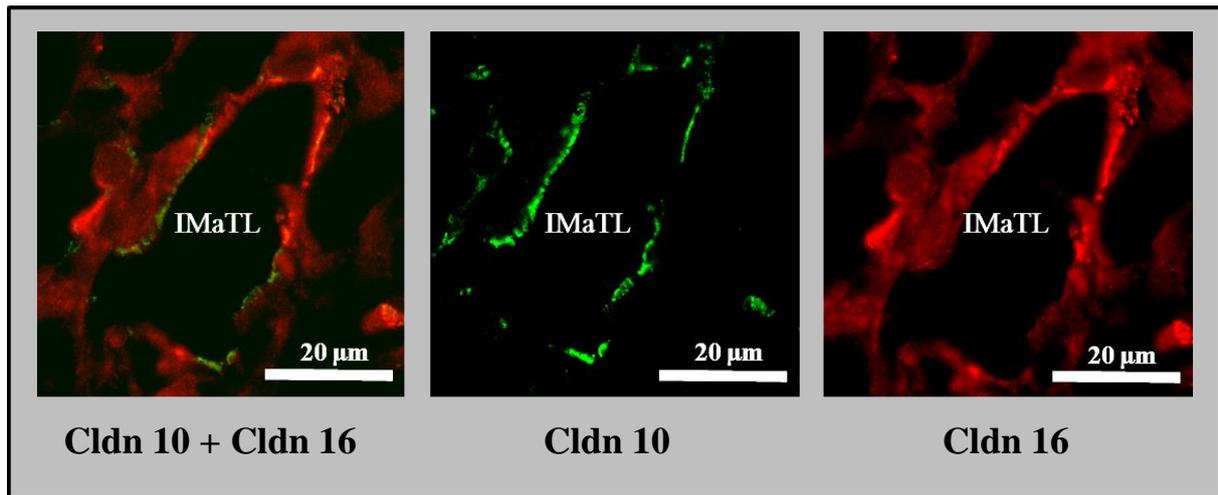


Abbildung 63: Claudin 10- und Claudin 16-Expression in einer IMaTL

Dargestellt ist eine Kofärbung von Claudin 10 (grün) und Claudin 16 (rot) einer IMaTL einer Ratte, die mit dDAVP behandelt worden ist. (A) zeigt die Kofärbung, (B) nur Claudin 10 und (C) nur Claudin 16. Es gibt keinen Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen. In Abbildung A ist im oberen Teil durch die mehr orange Färbung die Kolo-kalisation der Claudine in der Tight Junctions sichtbar, im unteren Teil scheint Claudin 10 unabhängig von Claudin 16 exprimiert zu sein.

3.2.3.6 Claudin 19-Expressionsmuster

3.2.3.6.1 unter Versuch 1

Claudin 19-Expression war ebenfalls zwischen allen Behandlungsgruppen gleich (Abbildung 64). Sie fand sich im IMCD (kästchenförmig, vermehrt basolaterale Vesikel) und in IMTL, wo sie vermehrt linienförmig auftrat und nur sehr selten schwach mäandernd erschien.

Das Vorhandensein von Claudin 19 in IMaTL wurde wie zuvor am Übergang in die TAL festgemacht. Spezifische Färbung zeigte sich auch im ISOM und somit in IMdTL. Der Übergang in die TAL sowie der ISOM sind hier nicht extra abgebildet, da sie sich nicht wesentlich von denen in Kapitel 3.2.3.2 unterscheiden.

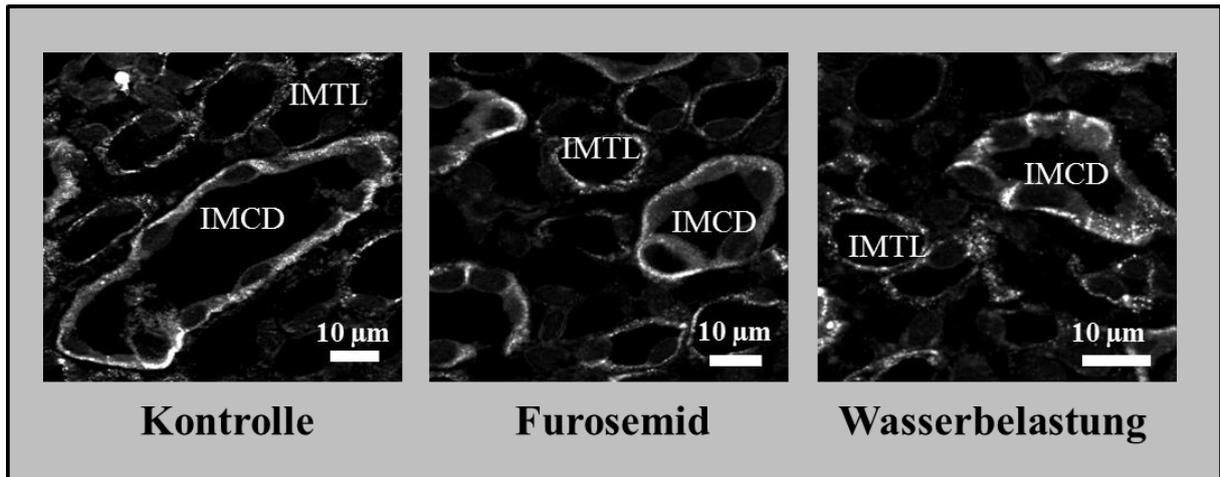


Abbildung 64: Claudin 19-Expression in der inneren Medulla

Alle drei Bilder zeigen einen Ausschnitt aus der inneren Medulla. Bei (A) handelt es sich um ein Versuchstier unter Kontrollbedingungen, bei (B) unter Furosemidbehandlung und bei (C) unter Wasserbelastung.

3.2.3.6.2 unter Versuch 2

Die Färbung sah vergleichbar zu der oben beschriebenen Färbung der Nierenschnitte der Tierversuchsratten aus Versuch 1 aus. Es zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Abbildung 65).

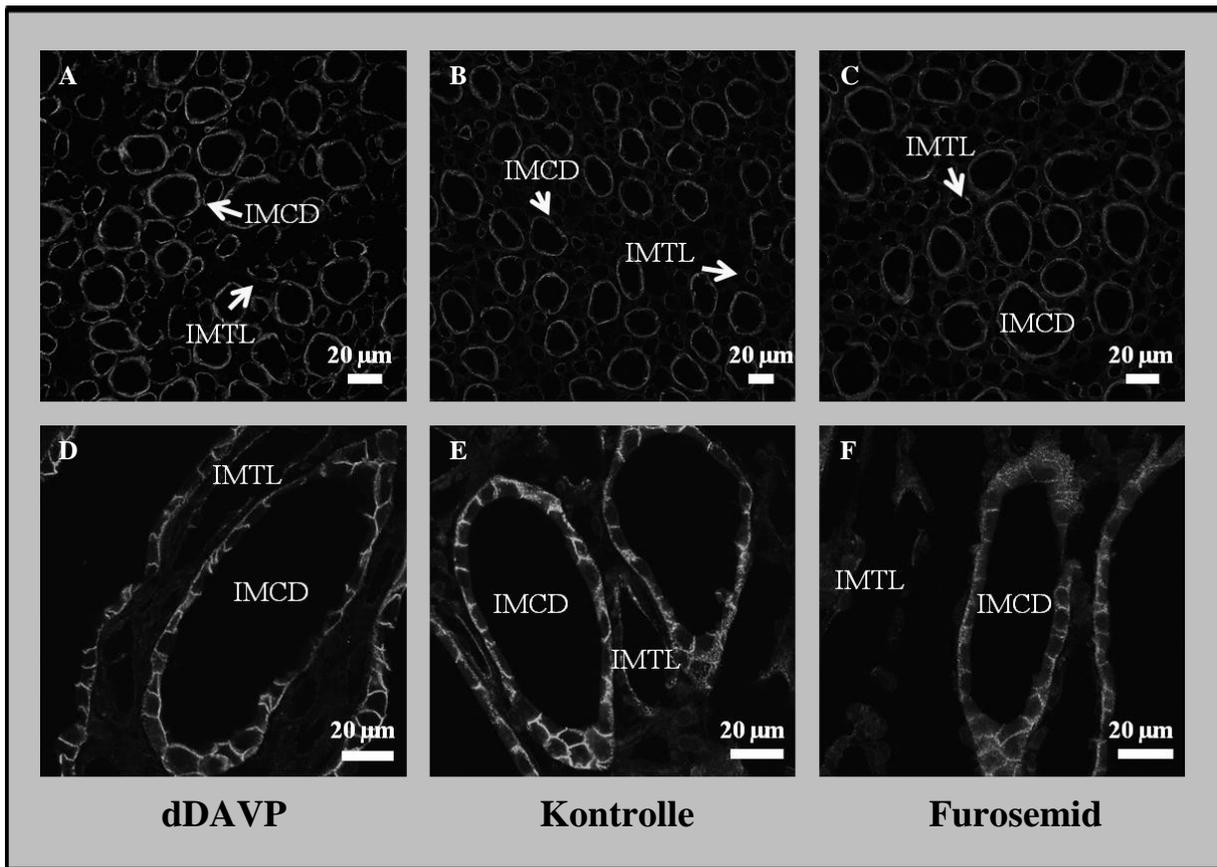


Abbildung 65: Claudin 19-Expression im IM vorbehandelter Tiere

Alle sechs Bilder zeigen einen Ausschnitt aus der inneren Medulla. Wobei (D), (E) und (F) jeweils die Vergrößerung von (A), (B) und (C) sind. Bei (A) und (D) handelt es sich um ein Versuchstier nach dDAVP-Behandlung, bei (B) und (F) um ein Tier nach Kontrollbedingungen und bei (C) und (F) um ein Tier unter Furosemidbehandlung. Zu sehen ist hier die Färbung von Claudin 19. Es gibt keine qualitativen Unterschiede zwischen den 3 Behandlungsgruppen.

3.2.3.7 Weitere Claudine

Abgesehen von den zuvor gezeigten Claudinfärbungen, wurden Claudin 3, 8 und 18 gefärbt. Hier konnte in der gesamten Niere keine spezifische Färbung erreicht werden.

4 Diskussion

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 *In vitro*-Ansatz

4.1.1.1 Gewinnung und Kultivierung der Primärzellen

Die IMCD Kultur ist bereits seit den 1980ern etabliert (36) und gilt als anerkanntes Mittel, Vorgänge im Sammelrohr des inneren Marks auf einfache Art zu untersuchen.

Die Gewinnung der Primärzellkultur war gut durchführbar und die IMCD Kulturen zeigten mit der Literatur vergleichbare Eigenschaften. Auf Filtern kultivierte IMCDs hatten einen Widerstand von ca. $50 \Omega \times \text{cm}^2$ (50) (87). Unterschieden werden muss hier zwischen den Kulturen unter 300 mOsm/kg und unter 600 mOsm/kg. Anders als in der Literatur beschrieben, zeigten die 600 mOsm-Kulturen niedrigere Widerstände (87).

Da die Kulturen immer wieder neu generierte Primärzellkulturen waren, hatten sie nicht die absolut gleichen Eigenschaften und verschiedene Grade der Dedifferenzierung (87).

In dieser Doktorarbeit wurden die IMCD-Zellen nach der Methode, die bei Maric et. al beschrieben wurde, gewonnen (69).

Ein Problem, bei der Gewinnung der IMCD-Kulturen stellte die Reinheit dieser Kulturen dar. Anders als in der Literatur beschrieben (87, 99), konnte keine Reinheit von mehr als 95% erreicht werden. Der Anteil der dünnen Schleifen lag bei ca. 15% unter Kontrollbedingungen und wurde durch die Kulturbedingungen beeinflusst. So nahm dieser Anteil z.B. unter höherer Osmolalität zu. Im Gegensatz zu früheren Präparationsmethoden wurden die Zellen bei Kultivierung keinem „hypotonen Schock“ ausgesetzt, welchem die Sammelrohrzellen robuster als die dünnen Schleifen gegenüberstehen (99). Dieser „hypotone Schock“ hätte die Reinheit erhöhen können, setzt aber auch die Zellen extremeren Bedingungen aus. Die alleinige Zentrifugation zur Reduktion der dünnen Schleifen (37) war also nicht ausreichend, um ihren Anteil möglichst gering zu halten. Aus diesem Grund wurde der Anteil der dünnen Schleifen mit ausgewertet und im Zusammenhang mit den Versuchsergebnissen diskutiert.

4.1.1.3 Expressionsanalyse

Bei der Expressionanalyse ist zu beachten, dass diese auf Ebene der Immunfluoreszenz stattfand. Es konnten also keine Unterschiede auf RNA-Ebene und auf Ebene der posttranslationalen Modifikation erkannt werden. Aber gerade für Claudine sind auch hier

Änderungen beschrieben worden. So konnten z. B. in einer Studie bei Claudin 10 im Jejunum und Pankreas Unterschiede zwischen mRNA-Expression und IF gezeigt werden (54). Für Claudin 4, 7 (63) und 16 (52) ist eine Phosphorylierung beschrieben worden.

4.1.2 Ex vivo Ansatz

Auf Grund der Grenzen des Zellkulturmodells in Bezug auf seine Vergleichbarkeit mit der *in vivo*-Situation wurde ein *ex vivo*-Ansatz durchgeführt. Hierfür wurden Tierversuchsratten bereits vor Entnahme der Nieren unterschiedlichen Behandlungen ausgesetzt. Durch deren zügige Entnahme und der direkt im Anschluss durchgeführten Experimente, bei denen Tubuli disseziert, anschließend direkt perfundiert und ebenfalls elektrophysiologisch untersucht wurden, kann von der Beibehaltung vieler physiologischer *in vivo* Eigenschaften ausgegangen werden (16).

4.1.2.1 Der metabolische Käfig

Der metabolische Käfig bietet zwar eine gute Möglichkeit die Stoffwechselfparameter zu kontrollieren, ist aber mit nicht unerheblichem Stress für die Tiere verbunden (9). In den vorliegenden Versuchen waren die verwendeten Tiere nicht über 6 Wochen alt. Es ist bekannt, dass die Stressanfälligkeit altersabhängig und bei jüngeren Tieren geringer ist (32). Durch Kontrolle des Gewichtes und des Fells der Tiere sowie ruhigen Bedingungen, Fütterung und Erhebung der metabolischen Daten zu festen Zeitpunkten von der gleichen Person, konnte unnötiger Stress vermieden und inadäquate Reaktionen rechtzeitig erkannt werden. Dennoch ist eine Veränderung der Stoffwechselfparameter und der Hormonlage der Tiere zu berücksichtigen. Durch absolute Gleichbehandlung, abgesehen von der unterschiedlichen Diät der Tiere, und Durchführung der elektrophysiologischen Messungen nach 3 Tagen Eingewöhnungszeit, sollte ein Vergleich der elektrophysiologischen Parameter möglich sein. Die Abstimmung des Gelfutters auf die täglichen Bedürfnisse der Tiere und die exakt auf das Körpergewicht abgestimmte Menge führte zu sehr gut reproduzierbaren Versuchsbedingungen mit unterschiedlichen Osmolalitäten (s. Kapitel 3.2.1).

4.1.2.2 Präparation und Tubulusperfusion

Bei der Tubuluspräparation wurde zwischen Sammelrohren, IMdTL und IMaTL unterschieden. Zur Unterscheidung wurden die in Kapitel 2.5.4.2.2 verwendeten Kriterien genutzt, die mit den bereits in der Literatur beschriebenen Kriterien übereinstimmten (79).

Die einfache Tubulusperfusion mit offenem Tubulusende erfordert eine Tubuluslänge, die eine stabile Spannungsmessung und Strominjektion ermöglicht. Ist das Tubulusende zu kurz oder die Längskonstante λ zu groß, geht ein Teil der gemessenen Signale durch Kurzschluß am offenen Tubulusende verloren (17). Für die Sammelrohre der IM war λ zu groß, sodass auf die quantitative Auswertung der Daten verzichtet werden musste. Die TL konnten mit ausreichender Qualität untersucht werden.

Die bei den CD und aTL gemessenen sehr kleinen, aber signifikanten Unterschiede von Null für V_{te} , werden der systematischen Auswertungsungenauigkeit zugeschrieben, die dadurch entstanden ist, dass die Systemnull nicht immer ganz konstant gehalten werden konnte.

4.2 Eigenschaften der IMCD-Primärzellkultur unter Einfluss verschiedener Osmolalitäten und Hormone

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die parazellulären Eigenschaften der Epithelien der im inneren Mark vorkommenden Nephronabschnitte näher zu charakterisieren und wenn möglich, Regulationswege aufzuklären.

Wegen der schweren Zugänglichkeit und Präparierbarkeit dieser Abschnitte wurde zunächst auf eine bereits gut etablierte Primärzellkultur zurückgegriffen (69). Dabei standen zunächst die Sammelrohrzellen im Vordergrund, wobei es sich allerdings um eine Mischkultur mit Anteilen von Zellen dünner Schleifen handelte.

Wenn man die Eigenschaften der IMCD-Zellen unter 600 mOsm/kg Kulturbedingungen als Ausgangssituation zu Grunde legt, lassen sich die Befunde wie folgt zusammenfassen:

- Eine Erniedrigung der Osmolalität auf 300 mOsm/kg führte zu einer sehr ausgeprägten Erhöhung von R_{te} , einem Verlust von Anionenselektivität des parazellulären Weges und der Verschiebung der beiden Claudine 7 und 19 von submembranären oder intrazellulären Vesikeln in die TJ.
- Die Zugabe von Aldosteron änderte keine der untersuchten Eigenschaften.
- Die Zugabe von AVP unter 300 mOsm/kg-Bedingungen erhöhte die Kationenselektivität, änderte aber nicht den Widerstand oder das Expressionsmuster von Claudin 7 und 19.
- Die Zugabe von AVP unter 600 mOsm/kg-Bedingungen erniedrigte den elektrogenen transzellulären Transport ($\Delta I'_{sc\ amil}$), mit gleichzeitiger Erhöhung von R_{te} , ohne die Ionenselektivität des parazellulären Weges oder die Claudinexpression zu verändern.
- Eine höhere CsA-Konzentration erniedrigte den elektrogenen transzellulären Transport

(ΔI_{sc}^{amil}) ohne Erhöhung von R_{te} , aber mit Steigerung der Anionenselektivität und vermehrt membranärer Lokalisation von Claudin-19.

- Zusätzlich erniedrigten plasmaitone Kulturbedingungen und AVP den Anteil der dünnen Schleifen in der Mischkultur, während CsA in niedriger Konzentration den Anteil erhöhte.

Diese Befunde werden im Folgenden mit der Literatur verglichen und diskutiert.

4.2.1 Plasma-isotone Bedingungen als Signal der Umdifferenzierung

Innermedulläre Sammelrohre sind in ihrer Umgebung normalerweise keinen 300 mOsm/kg ausgesetzt (19). Solch niedrige Osmolalität ist nur weiter kortikal zu finden. Betrachtet man kortikale Sammelrohre im Vergleich zu innermedullären, so fällt auf, dass diese einen höheren Widerstand (91), ein negativeres transepitheliales Potential (98) und eine höhere ENaC-Aktivität (30) besitzen. Mit Ausnahme des höheren ENaC-vermittelten Transportes konnte dies auch im Vergleich zwischen den 300 mOsm/kg-Kulturen, die eher kortikalen Bedingungen ausgesetzt waren, und den 600 mOsm/kg-Kulturen, deren Osmolalität der medullären Umgebung entsprach, gefunden werden (s. Kapitel 3.1.1). In ausgedehnteren Experimenten, durchgeführt in unserer Arbeitsgruppe von Annalisa Ziemens, konnte auch der Unterschied im ENaC-vermittelten-Transport gezeigt werden (Doktorarbeit Annalisa Ziemens, persönliche Mitteilung). Einige der elektrophysiologischen Befunde könnten somit auf einer Differenzierung der innermedullären Sammelrohrzellen zu Sammelrohrzellen mit kortikalen Eigenschaften beruhen.

Die Um- oder Dedifferenzierung ist jedoch nicht vollständig und Aldosteron, unter 300 mOsm/kg, also „kortikalen“ Bedingungen getestet, zeigte keine Einfluss gerade auch auf die transzellulären Transporteigenschaften. ENaC war also, wenn überhaupt, nur unwesentlich stimuliert. In der Literatur sind dazu unterschiedliche Befunde zu finden. Während Husted (51) eine Stimulierbarkeit von IMCD-Primärzellen auf Filtern durch Aldosteron zeigen konnte, fanden Frindt et al. nur einen geringen Transport nach tagelanger Stimulation durch Aldosteron in IMCD-Zellen (30). Unsere *in-vitro* IMCD-Kulturen scheinen ebenfalls über keinen funktionellen Mineralkortikoidrezeptor und die dazugehörige Signalkaskade zu verfügen. In Westernblot-Analysen von anderen IMCD-Kulturen konnte der Mineralokortikoidrezeptor aber prinzipiell nachgewiesen werden (15).

Für die Zielsetzung dieser Arbeit war der parazelluläre Weg von besonderem Interesse. Da hier die Claudine maßgeblich an der Vermittlung der Eigenschaften beteiligt sind, wurden Claudin

19 (bereits in der Doktorarbeit von Annalisa Ziemens näher betrachtet) und zusätzlich Claudin 7 näher untersucht, um die Befunde höherer R_{te} und geringere Anionenselektivität zu erklären. Claudin 19 wird allgemein als Barriere-formend beschrieben, wobei nicht klar ist, für welche Ionen die Barriere selektiv ist (4, 48). Es gehört somit zu den Claudinen, die bei vermehrter Expression den transepithelialen Widerstand erhöhen und tatsächlich findet es sich unter 300 mOsm/kg-Bedingungen vermehrt in der Membran. Claudin 7 verhält sich ähnlich zu Claudin 19 und kommt ebenfalls bei niedriger Osmolalität vermehrt in der Membran vor. Zu seiner Rolle in der Regulation des parazellulären Transportwegs gibt es keine einheitliche Meinung (1, 40, 44, 103). Bei Betrachtung der alleinigen elektrophysiologischen Parameter würde von den beschriebenen Eigenschaften nur die der Barriere für Cl^- (1), wie schon für Claudin 19 (4, 48) beschrieben, zu den Ergebnissen passen. Denkbar ist, dass die Widerstandserhöhung auf die Barrierefunktion der beiden Claudine zurückzuführen ist und die Permeabilitätsveränderung durch andere nicht untersuchte Claudine verursacht wurde.

Zusammenfassend werden die IMCD Kulturen durch die plasma-isotone oder die medulla-isotone Kulturbedingung deutlich abgrenzbar in zwei Funktionszustände versetzt.

4.2.2 Die Wirkung von AVP auf die beiden Funktionszustände der IMCD-Kultur

Neben der Wasserdurchlässigkeit des Sammelrohrs reguliert AVP zusätzlich unterstützend den transzellulären Salztransport. Im Sammelrohr wird ENaC-abhängiger Natriumtransport stimuliert (6, 59, 91), ebenso auch die TAL als Motor des Gegenstrommechanismus. In der TAL werden transzellulärer und parazellulärer Natriumtransport synchron hochreguliert (41). Wie AVP die Claudine beeinflusst, ist dabei aber nicht völlig klar. In der TAL wird die Phosphorylierung von Claudin10b diskutiert (41). Im endolymphatischen Sack des Innenohres konnte unter AVP eine vermehrte Translokation von Claudin 4 in die Membran gezeigt werden (89).

Wie in der TAL führte die Stimulation mit AVP auch in den IMCD-Kulturen unter 300 mOsm/kg zu einer Zunahme der Kationenselektivität. Hierzu passt das unbeeinflusste Expressionsmuster von Claudin 7 und 19, wie im vorherigen Kapitel beschrieben. Die Claudine scheinen in den Kulturen eher Barriere-formend zu sein und keinen Einfluss auf die Selektivität zu haben. Die submembranäre Abnahme von Claudin 19 unter AVP wird bei gleichzeitig fehlender einzelner Zu- oder Abnahme der anderen Verteilungsmuster als nicht relevant für die Veränderung der Funktionalität eingeschätzt. Andere Claudine, z.B. Claudin 4, wurden nicht

untersucht und Claudin 10 kommt in Sammelrohren nicht vor.

Die Messergebnisse unter 600 mOsm/kg-Bedingungen lassen sich nicht durch die Literatur erklären. Im Gegensatz zu der beschriebenen Stimulation von ENaC (6, 59, 91), nahm der elektrogene transzelluläre Transport ($\Delta I'_{sc \text{ amil}}$) ab, R_{te} stieg dadurch an und V_{te} war auf Grund der geringeren Na^+ -Reabsorption weniger negativ.

Zu beachten ist hier, dass, wie bereits zuvor beschrieben, die IMCD-Kulturen keine Reinkulturen waren, sondern Mischkulturen. AVP unter 600 mOsm/kg hatte einen deutlichen Einfluss auf den prozentualen Anteil der dünnen Schleifen in der Kultur. Dieser nahm unter AVP-Einfluss ab. Die dünnen Schleifen hatten einen niedrigeren Widerstand als die IMCD-Zellen. Somit nahm der Widerstand unter AVP bei geringerer Anzahl von Zellen dünner Schleifen zu. Die Veränderungen im elektrogenen transzellulären Transport lassen sich hierdurch nicht erklären.

4.2.3 CsA und Osmoregulation

Zunächst ist der Einsatz von Cyclosporin unter der Annahme der Hemmung des osmosensitiven Transkriptionsfaktors TonEBP (88, 94) kritisch zu hinterfragen. Eine ausführlichere Literaturrecherche ergab, anders als zunächst vermutet, Erkenntnisse über die Rolle von Cyclosporin A im inneren Nierenmark unabhängig von TonEBP. Unter anderem soll die vermehrte Apoptose unter CsA unabhängig von Calcineurin und TonEBP sein (90).

Die Unterschiede im Hinblick auf die TonEBP abhängige bzw. unabhängige Wirkung von CsA werden der toxisch zu hohen Konzentration von CsA zugeschrieben. CsA hatte in niedrigeren Konzentrationen bei ebenfalls vollständiger Calcineurinhemmung keinen direkten Effekt auf TonEBP (64).

CsA scheint also über die Hemmung der AQP2-Kanäle (84) und der Na^+ -Reabsorption (64) eine direkte Hemmung der Konzentrierungsmechanismen und der Anpassung an hyperosmolale Bedingungen zu bewirken, jedoch nur indirekt über TonEBP.

An den Kulturen waren zwei Konzentrationen getestet worden: 50 ng/ml und 5 $\mu\text{g/ml}$. Die Konzentration von 50 ng/ml sollte bereits für die Wirkung von CsA ausreichen, während die Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ als toxisch beschrieben wurde (64). Eine vermehrte Apoptose der Zellen konnte nicht eindeutig beobachtet werden. Die Konfluenz war unter allen drei Bedingungen gegeben. Eine toxische Reaktion der Zellen auf CsA wird daher nicht angenommen. Für die Wirkung auf den elektrogenen transzellulären Transport ($\Delta I'_{sc \text{ amil}}$) ließ sich eine Konzentrationsabhängigkeit erahnen, wobei die Hemmung für die niedrigere

Konzentration nicht signifikant war. CsA wird in der Literatur jedoch als Stimulator für ENaC beschrieben, was den in dieser Doktorarbeit herausgefundenen Ergebnissen widerspricht (108). Wie bereits im Kapitel 4.2.1 beschrieben, reagierten die IMCD-Zellen auch auf Aldosteron nicht mit einer ENaC-Stimulation. Die weitere Abnahme des elektrogenen transzellulären Transport unter CsA könnte an der eventuell doch toxischen Konzentration und deren Einfluss auf die Transportvorgänge liegen (64).

Eine weitere Hypothese für die Erklärung der Messergebnisse wäre die Hemmung der $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase (64), die den Motor für die passive Na^+ -Reabsorption bildet. Durch ihre Hemmung könnte also der Gradient für den Transport mit ENaC verringert werden. Der verringerte Transport positiver Ladung führte wiederum zum weniger lumennegativen Potential.

5 $\mu\text{g/ml}$ CsA führte parazellulär zu einer vermehrten Anionenselektivität, wobei die Permeabilität für Na^+ abnahm. In der Literatur wird CsA zwar für einen gestörten parazellulären Transport verantwortlich gemacht (66), CsA führt hier jedoch in einer kortikalen Sammelrohrkultur zu einer Erhöhung des transepithelialen Widerstands. Liu et al. fanden passend dazu eine erhöhte ZO-1 Expression in der TJ. Die Selektivität und Claudinexpression wurde in dieser Studie nicht untersucht.

Betrachtet man im Hinblick auf den veränderten parazellulären Transport die Claudine, so zeigte sich hier Claudin 19 unter 5 $\mu\text{g/ml}$ CsA vermehrt membranär und weniger vesikulär, d.h. vermehrt in der TJ. Die Annahme, dass Claudin 19 barrierebildend wirkt (s. Kapitel 4.2.1), kann dadurch gestützt werden, dass R_{te} unter 5 $\mu\text{g/ml}$ CsA zwar nicht signifikant zunahm, aber tendenziell höher war als unter Kontrollbedingungen. Die Hypothese beibehaltend, dass Claudin 19 barrierebildend für Anionen ist (4, 48), scheint es nicht für die Veränderungen in der Ionenselektivität verantwortlich zu sein.

4.2.4 IMCD-Kulturen als Mischkultur

Die bis hierhin diskutierten Überlegungen betreffen primär den Sammelrohranteil der Kultur, der unter allen Bedingungen den größten Teil der Kultur ausmachte. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kulturen sind wahrscheinlich durch die Sammelrohrzellen mit dem deutlich höheren Widerstand dominiert und nur für diese Zellen wurde die Claudin-Expression dokumentiert. Der Einfluss der Zellen dünner Schleifen mit ihrem geringen Widerstand und keiner Selektivität der dTL bei unterschiedlicher Osmolalität ($P_{\text{Na}^+/\text{Cl}^-} \sim 1$) und einer erhöhten Kationenselektivität der aTL nur bei Wasserdiurese (erniedrigte luminale Osmolalität und Unterdrückung der AVP Ausschüttung), führte wahrscheinlich

lediglich zu einer Unterschätzung des Widerstands. Die erhöhte Kationenselektivität unter niedriger Osmolalität wird bei den 300 mOsm/kg Kulturbedingungen dadurch ausgeglichen, dass der Anteil der Zellen dünner Schleifen unter dieser niedrigen Konzentration deutlich geringer war. Vermutlich sind die Befunde für die Sammelrohrzellen deshalb attenuiert, jedoch durch die Ko-Kultur mit den Zellen dünner Schleifen nicht qualitativ fehlinterpretiert.

Generell ist die Beurteilung der Befunde durch die Mischkultur erschwert und in den jeweiligen Kapiteln, falls relevant, mit diskutiert. Zusätzlich veränderten, wie bereits oben erwähnt, die getesteten Kulturbedingungen aber auch ihrerseits die Zusammensetzung der IMCD-Kultur.

Unter 600 mOsm/kg-Bedingungen waren fast doppelt so viele Zellen dünner Schleifen zu finden wie bei 300 mOsm/kg (s. Kapitel 3.1.1.3). Da die Präparation bei beiden Kulturbedingungen gleich ablief, kann davon ausgegangen werden, dass im Durchschnitt gleich viele Zellen dünner Schleifen vorhanden waren. Bis auf das Zellkulturmedium wurde an der Kultivierung nichts verändert. Die Zellen wurden zuvor unter Verwendung von PBS, das eine Osmolalität von ca. 300 mOsm/kg besaß, gewonnen. Diese Osmolalität wurde also für die Zellen der 600 mOsm-Kulturen abrupt hochgesetzt. Wie bereits in Kapitel 4.1.1.1 erwähnt, wurden frühere IMCD-Kulturen durch einen „hypotonen Schock“ gereinigt (99), welchen die IMCD-Zellen besser überstanden. Hier war das Gegenteil der Fall und unter 600 mOsm/kg herrschten hypertone Bedingungen. Anzunehmen ist, dass auch unter der hypotoneren Bedingung von 300 mOsm/kg die dünnen Schleifen weniger robust waren.

Zu beachten ist außerdem, dass Wachstumsfaktoren, Hormone etc. sowie das Wachstum auf Filtermembranen nicht der natürlichen Umgebung entsprechen und dies für die Sammelrohrzellen problematisch ist (19). Die dünnen Schleifen haben in dieser unnatürlichen Umgebung eventuell die besseren Überlebenschancen.

Welche der Faktoren das Überleben oder die Proliferation der Sammelrohrzellen gegenüber den Zellen dünner Schleifen maßgeblich beeinflussen und aus welchem Grund diese Faktoren für die Zellen dünner Schleifen nicht von gleicher Bedeutung waren, wurde nicht näher untersucht.

Unter Applikation von AVP bei 600 mOsm/kg kam es zu einer Abnahme der Zellen dünner Schleifen in den Kulturen. AVP wird bei erhöhter Osmolalität im Körper freigesetzt und spielt eine entscheidende Rolle im Prozess der Harnkonzentrierung (96). Durch Einbau von Aquaporinen und Induzierung anderer Transportwege (59) könnte es in der Kultur den osmotischen Stress auf die IMCD-Zellen reduzieren und somit zu vermehrter Proliferation der Sammelrohrzellen führen. Außerdem kann eine intrazelluläre Erhöhung von cAMP (wie über den V2R) zellzustandsabhängig zur Proliferation oder sogar zu ihrem Gegenteil führen (113).

Unter 50 ng/ml CsA war eine signifikante Erhöhung des Anteils an Zellen dünner Schleifen zu sehen, während dieser sich zwar unter der höheren Konzentration von 5 µg/ml abzeichnete, aber nicht signifikant war. CsA könnte die Anpassung der IMCD-Zellen an die osmotischen Bedingungen erschweren, da zwar unter anderem die Na⁺-K⁺-ATPase gehemmt und dadurch zwar ATP gespart wird, der Transport von Ionen allerdings für die Anpassung an das osmotische Milieu notwendig ist (29). Zudem veränderte sich auch die Tight junction-Morphologie (66). Inwieweit die Anpassung an die Osmolalitätsveränderung dadurch behindert war, ist nicht abschließend geklärt. Unter 5 µg/ml CsA könnte der toxische Effekt wiederum (64) vermehrt Zellen dünner Schleifen treffen und somit den IMCD-Zellen einen Proliferationsvorteil bringen. Durch mangelnde Erkenntnisse aus der Literatur über die Wirkung von CsA auf dünne Schleifen ist dies spekulativ.

Die zum Teil widersprüchlichen Befunde der IMCD Kultur und die Überlegung zu Umdifferenzierungsvorgängen machten die Untersuchung nativer Tubulussegmente notwendig.

4.3 Effekt verschiedener Diuresezustände auf die Transporteigenschaften der dünnen Schleifen

Eine wesentliche Erkenntnis der Primärzellkulturversuche war die Bedeutung der TL im Prozess der Harnkonzentrierung. Sie wurden aus diesem Grund isoliert untersucht.

4.3.1 IMdTL sind primär unselektiv und exprimieren Claudin 2, 4, 7 und 19

Die Transporteigenschaften von IMdTL wurden zumeist im Hinblick auf Wasser- und Harnstofftransport untersucht, da sie keine, mit Ausnahme der tieferen 60% der dTL, Transporter oder Kanäle für NaCl-Transport besitzen. Da die Morphologie der TL mit den funktionellen Eigenschaften übereinstimmt (79) und für die Identifikation der aTL und der dTL klare morphologische Kriterien vorlagen, wird nicht davon ausgegangen, dass die dissezierten und untersuchten dTL den ClC-Ka exprimierten (26, 78, 79).

Imai et al. haben P_{Na⁺} durch Tubulusperfusion untersucht und konnten eine Abnahme von P_{Na⁺} entlang der dTL zeigen (53).

Bei unseren *ex vivo* perfundierten dTL konnten ebenfalls nur ein geringer transepithelialer Widerstand und ein geringes Diffusionpotential gemessen werden. Da die dTL der inneren Medulla entnommen wurden, passt dies zu der in der Literatur beschriebenen geringen Permeabilität (53). R_{te} lag in unseren Messungen zwischen 14 und 16 Ω × cm² und die Tubuli

waren nahezu unselektiv ($P_{\text{Na}^+/\text{Cl}^-} = 0,96$). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der elektrophysiologischen Parameter zwischen den drei Versuchsgruppen. Auf Grund der oben beschriebenen fehlenden Rolle der dTL im NaCl-Transport, wurden hier aber auch keine Veränderungen erwartet.

Übereinstimmend hierzu traten auch keine Veränderungen im Claudinexpressionsmuster auf. Wie in der Literatur (40, 46) beschrieben, konnte Claudin 2, 4 (75) und 7 in den IMdTL nachgewiesen werden. Färbungen von Claudin 8, welches ebenfalls in den IMdTL vorkommt (46), sind nicht gelungen. Zusätzlich konnte Claudin 19 in TLs des ISOMs angefärbt werden, was somit für eine Lokalisation in dTL spricht, da im ISOM die aTL bereits in TAL übergegangen sind. Da es keine Unterschiede in den verschiedenen Versuchsgruppen gab, soll hier nicht näher auf die Claudine eingegangen werden.

4.3.2 Aufsteigende dünne Schleifen werden bei Wasserdiurese parazellulär kationenselektiver

aTL sind wasserundurchlässig und exprimieren den CLC-Ka (23). Obwohl Harnstoff-Transporter fehlen, ist hier die Permeabilität für Harnstoff hoch (76). Des Weiteren wird parazellulär Na^+ reabsorbiert (100). Messungen des transepithelialen Potentials in aTL ohne Vorhandensein eines NaCl-Gradienten zeigten Werte, die sich nicht von Null unterschieden (67), was gegen aktive elektrogene Transportvorgänge spricht. Bei vorhandenem NaCl-Konzentrationsgradienten konnte ein lumenpositives transepitheliales Potential gezeigt werden (42).

Bei unseren *ex vivo* durchgeführten elektrophysiologischen Messungen an isoliert perfundierten aTL war V_{te} nur in der Kontrollgruppe von Null verschieden und zeigte sich hier übereinstimmend mit der Literatur lumenpositiv. R_{te} der drei Versuchsgruppen lag im Durchschnitt zwischen 14 und 15 $\Omega \times \text{cm}^2$ und I_{sc} war gering, ähnlich den dTL. Dies unterstreicht die fehlenden aktiven elektrogenen Transportprozesse.

Beim DP und bei $P_{\text{Na}^+/\text{Cl}^-}$ konnten zwischen der Kontrollgruppe und der Wasserbelastungsgruppe sowie der Furosemidgruppe und der Wasserbelastungsgruppe Unterschiede gemessen werden. DP wurde mit abnehmender Osmolalität negativer und $P_{\text{Na}^+/\text{Cl}^-}$ kationenselektiver.

Das negativere DP unter Wasserbelastung und die vermehrte Kationenselektivität könnten sich auch durch das Konzentrierungsmodell erklären lassen. Die Versuchstiere waren zwei verschiedenen Zuständen ausgesetzt: Antidiurese und Wasserdiurese. Zur Regulation des

Wasserhaushalts und der Transportvorgänge in der inneren Medulla stehen die Osmolyte NaCl und Harnstoff zur Verfügung. Unter Antidiurese wird Harnstoff, durch AVP gefördert, vermehrt reabsorbiert (13). Dadurch steigt die Osmolalität im inneren Nierenmark und in der IMdTL wird vermehrt Wasser reabsorbiert. Dadurch erhöht sich die NaCl-Konzentration im Lumen von IMdTL und IMaTL und der NaCl-Gradient über das Epithel der IMaTL erhöht sich. Unter Wasserdiurese wird die Harnstoff-Reabsorption nicht durch AVP gefördert (13). Harnstoff ist im Interstitium dadurch niedriger ebenso wie die Osmolalität. Wasser wird weniger reabsorbiert in IMdTL und die NaCl-Konzentration in IMaTL ist geringer. Der NaCl-Gradient unter Wasserdiurese ist also kleiner als unter Antidiurese. Durch die Erhöhung von P_{Na^+/Cl^-} , welche bei Betrachtung der verantwortlichen Tubuli (Tubuli, die eine Erhöhung von P_{Na^+/Cl^-} zeigten) auf einer Erhöhung von P_{Na^+} beruht ($p < 0,05$), wird der geringere NaCl-Gradient unter Wasserdiurese kompensiert. Da sich P_{Na^+} erhöht, steigt durch die Parallelschaltung die Triebkraft für Cl^- . Die Triebkraft für transzellulären Cl^- -Transport via CLCKa wird durch das lumenegative DP verstärkt und aufsteigende dünne Schleifen werden unter Wasserbelastung parazellulär kationenselektiver (Abbildung 66).

Es zeigte sich hier eine deutliche Abhängigkeit von der Osmolalität. Unter Antidiurese wurden keine DP's mit hoher Negativität gesehen, während die Anzahl negativerer DP's mit steigender Osmolalität zunahm.

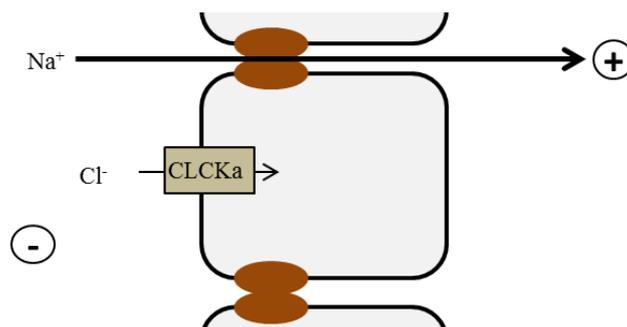


Abbildung 66: IMaTL unter Wasserbelastung

Zelle einer IMaTL mit ihren Transportvorgängen: Unter Wasserbelastung könnte die vermehrte parazelluläre Na⁺-Reabsorption mit dem dadurch generierten lumenegativen Potential die transzelluläre Cl⁻-Reabsorption erleichtern.

Untersuchungen der Claudinexpressionsmuster ergaben keine Unterschiede zwischen den drei Behandlungsgruppen. Claudin 4, 10, 16 und 19 konnten in IMaTL nachgewiesen werden. Diese Claudine konnten bereits in vorherigen Studien in IMaTL gefunden werden (40, 46).

Da sich die Auswertung der Claudinexpressionsmuster auf qualitative Unterschiede bezieht und keine posttranslationale Modifikation oder Veränderungen auf RNA-Ebene nachweist, ist eine Beteiligung der Claudine an den elektrophysiologisch gemessenen Veränderungen nicht auszuschließen und bedarf weiterer Untersuchungen. Hier könnte insbesondere Claudin 10b von Interesse sein, welches als kationenselektiv beschrieben worden ist (14, 70).

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die innere Medulla ist komplex und wenig erforscht. Osmolalität selbst und Hormone regulieren die Transporteigenschaften, weshalb eine geschickte Kombination von Zellkulturexperimenten sowie Experimente am Tubulus und am Gesamttier weitere Aufklärung bringen können.

Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass die Zellkultur eine gute Methode ist, um einen Einblick in mögliche Regulationsvorgänge und Zelleigenschaften zu bekommen, diese aber sehr anfällig für Veränderungen der Kulturbedingungen ist. Die durchgeführten Experimente sind von der Umdifferenzierung der IMCD-Zellen geprägt. Gleichzeitig zeigen sie allerdings, dass sowohl AVP als auch CsA einen Einfluss auf die Transporteigenschaften besitzen. Aus diesem Grund sind weitere experimentelle Untersuchungen *ex vivo* an Sammelrohren sinnvoll, um validere Erkenntnisse insbesondere über den Einfluss von AVP zu erhalten. Gleichzeitig würde es sich lohnen, die Sammelrohre erneut *ex vivo* mit veränderter Messtechnik unter Wasser- und Antidiurese zu untersuchen.

Des Weiteren konnte durch die Tubulusperfusion zwar die Bedeutung unterschiedlicher diuretischer Zustände in Bezug auf die Transportvorgänge in IMaTL gezeigt werden, es ist aber bis jetzt unklar, inwieweit die Claudine eine Rolle spielen. Immunfluoreszenzfärbungen stoßen hierbei an ihre Grenzen. Für quantitative Untersuchungen könnte die PCR sinnvoll sein. Veränderungen in der Phosphorylierung könnten ebenfalls Ziel weiterer Untersuchungen sein. Gerade Claudin 10, welches zahlreich in der IMaTL zu finden ist und als kationenselektiv (Claudin 10b) beschrieben worden ist, dürfte für weitere Untersuchungen interessant sein.

Zusammenfassend bieten die vorliegenden Daten und die Erfahrungen mit den Versuchstechniken einen guten Ausgangspunkt, um die Regulation der Tight Junctions, der Zellen und der Nephronabschnitte im inneren Nierenmark weiter zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die Niere als lebenswichtiges Organ hat eine Reihe von unterschiedlichen Funktionen. Eine ihrer wichtigen Aufgaben ist die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes. So ist die Niere in der Lage, die Urinosmolalität zwischen ca. 50 und 1300 mOsm/kg zu regulieren. Obgleich die Prinzipien der Harnkonzentrierung im äußeren Nierenmark durch die Mechanismen der Gegenstrom-Multiplikation erklärt werden konnten, werden die Mechanismen im inneren Nierenmark noch nicht vollständig verstanden.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die Epithelien der Nephronabschnitte des inneren Nierenmarks mit Hilfe einer Primärzellkultur und *ex vivo* am isoliert perfundierten Tubulus untersucht. Dabei wurde der transepitheliale Transport mit den Parametern Widerstand, Potential und Diffusionspotential charakterisiert. Weiter wurde der Kurzschlussstrom und die Kationen- oder Anionenselektivität berechnet. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem noch weniger erforschten parazellulären Transportweg. Da dieser in seiner Eigenschaft maßgeblich von Claudinen bestimmt wird, wurde die Lokalisation verschiedener Claudine qualitativ in Bezug auf die TJ mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht.

Die Primärzellkulturen wurden auf permeablen Filtern kultiviert und beidseits Osmolalitäten ausgesetzt, die entweder der interstitiellen Osmolalität im Mark (600 mOsm/kg) oder der plasmatisotonen Osmolalität der Rinde (300 mOsm/kg, plasmatisoton) ähnelten. Eine niedrige Osmolalität führte zu einer massiven Erhöhung des Widerstandes und zu einer deutlichen Reduktion der Anionenselektivität. Dies wurde von einer Verschiebung der Claudine 19 und 7 von vesikulären Strukturen in die Membran begleitet. Aldosteron hatte keinen Einfluss auf die parazellulären Eigenschaften. Antidiuretisches Hormon hatte je nach Osmolalität unterschiedliche Auswirkungen auf Widerstand und Selektivität.

Die systematische Betrachtung aller Primärzellkulturen ergab, dass es sich im Gegensatz zur Literatur um keine reine Sammelrohrzellkultur handelte. Inseln mit Zellen dünner Schleifen konnten anhand der charakteristischen Tight Junctions identifiziert werden, wobei plasmatisotone Kulturbedingungen und AVP den Anteil der dünnen Schleifen in der Mischkultur erniedrigten und Cyclosporin A in niedriger Konzentration den Anteil erhöhte. Die Tatsache, dass eine Mischkultur vorlag, erforderte eine kritische Interpretation der Daten. Die dominierenden und hauptsächlich vorhandenen Sammelrohrzellen reagierten aber definitiv auf sinkende Umgebungsosmolalität mit erhöhtem Widerstand und geringerer Anionenselektivität. Die Widerstandszunahme ist dabei wahrscheinlich abhängig von der Tight junction-Expression von Claudin 7 und 19, die Selektivitätsänderung eher von anderen Claudinen.

Die *ex vivo*-Untersuchungen wurden an Nephronsegmenten von Ratten unterschiedlicher Diuresezustände untersucht. Über Gelfutter erhielten die Tiere entweder eine niedrig-normale Wassermenge (Antidiurese/Kontrolle), eine dreifach erhöhte Wassermenge (Wasserdiurese/-belastung) oder zusätzlich Furosemid um das Interstitium des Nieremarks auszuwaschen (Furosemid).

Absteigende dünne Schleifen zeigten weder Potential noch Selektivität zwischen Kationen oder Anionen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Diuresegruppen.

Die aufsteigenden dünnen Schleifen zeigten eine vermehrte Kationenselektivität unter Wasserbelastung ($P_{\text{Na}^+/\text{Cl}^-} = 1,53 \pm 0,21$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,99 \pm 0,02$) und auch nach Furosemid kam es tendenziell zu einer Änderung der Kationenselektivität ($1,22 \pm 0,18$). Claudin-Expressionsanalysen an Nierenschnittpräparaten dieser Tiere sowie von Tieren einer weiteren Versuchsgruppe, die mit AVP bzw. Furosemid behandelt wurde, zeigten in der Immunfluoreszenz für Claudin 2, 4, 7, 10, 16 und 19 keine Unterschiede zwischen den Behandlungen.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass der parazelluläre Weg im Sammelrohr und in den dünnen aufsteigenden Henle-Schleifen reguliert ist. Diese Regulation findet wahrscheinlich über die Modifikation von vorhandenen Claudinen posttranslational statt.

Da unter Wasserbelastung im Gegensatz zur Antidiurese ein geringerer transepithelialer Konzentrationsgradient für NaCl über das Epithel der aufsteigenden dünnen Schleifen vorliegt, könnte die parazelluläre Anhebung der Na^+ -Permeabilität zu einer Erleichterung der NaCl-Resorption über ein Diffusionspotential in diesem Segment beitragen.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Bedeutung der verschiedenen Osmolalitätszustände für die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen und Tubuli sowie die Notwendigkeit der weiteren experimentellen Untersuchung.

6 Literaturverzeichnis

1. **Alexandre MD, Lu Q, and Chen YH.** Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *Journal of cell science* 118: 2683-2693, 2005.
2. **Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Bergs M, Amasheh M, Schulzke JD, and Fromm M.** Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation. *Biochemical and biophysical research communications* 378: 45-50, 2009.
3. **Andres-Hernando A, Lanasma MA, Rivard CJ, and Berl T.** Nucleoporin 88 (Nup88) is regulated by hypertonic stress in kidney cells to retain the transcription factor tonicity enhancer-binding protein (TonEBP) in the nucleus. *The Journal of biological chemistry* 283: 25082-25090, 2008.
4. **Angelow S, El-Husseini R, Kanzawa SA, and Yu AS.** Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19. *American journal of physiology Renal physiology* 293: F166-177, 2007.
5. **Bagnasco SM.** How renal cells handle urea. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 10: 379-384, 2000.
6. **Bankir L, Bichet DG, and Bouby N.** Vasopressin V2 receptors, ENaC, and sodium reabsorption: a risk factor for hypertension? *American journal of physiology Renal physiology* 299: F917-928, 2010.
7. **Barry PH, and Diamond JM.** Junction potentials, electrode standard potentials, and other problems in interpreting electrical properties of membranes. *The Journal of membrane biology* 3: 93-122, 1970.
8. **Barry PH, and Lynch JW.** Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *The Journal of membrane biology* 121: 101-117, 1991.
9. **Beerling W, Koolhaas JM, Ahnaou A, Bouwknecht JA, de Boer SF, Meerlo P, and Drinkenburg WH.** Physiological and hormonal responses to novelty exposure in rats are mainly related to ongoing behavioral activity. *Physiology & behavior* 103: 412-420, 2011.
10. **Berl T.** How do kidney cells adapt to survive in hypertonic inner medulla? *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 120: 389-401, 2009.
11. **Blasig IE, Bellmann C, Cording J, Del Vecchio G, Zwanziger D, Huber O, and Haseloff RF.** Occludin protein family: oxidative stress and reducing conditions. *Antioxidants*

& redox signaling 15: 1195-1219, 2011.

12. **Blessing NW, Blount MA, Sands JM, Martin CF, and Klein JD.** Urea transporters UT-A1 and UT-A3 accumulate in the plasma membrane in response to increased hypertonicity. *American journal of physiology Renal physiology* 295: F1336-1341, 2008.
13. **Boron FWB, E. L.** *Medical Physiology*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009.
14. **Breiderhoff T, Himmerkus N, Stuver M, Mutig K, Will C, Meij IC, Bachmann S, Bleich M, Willnow TE, and Muller D.** Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 14241-14246, 2012.
15. **Brem AS, Morris DJ, Ge Y, Dworkin L, Tolbert E, and Gong R.** Direct fibrogenic effects of aldosterone on normotensive kidney: an effect modified by 11beta-HSD activity. *American journal of physiology Renal physiology* 298: F1178-1187, 2010.
16. **Burg MB.** Perfusion of isolated renal tubules. *The Yale journal of biology and medicine* 45: 321-326, 1972.
17. **Burg MB, Isaacson L, Grantham J, and Orloff J.** Electrical properties of isolated perfused rabbit renal tubules. *The American journal of physiology* 215: 788-794, 1968.
18. **Burg MB, Kwon ED, and Kultz D.** Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annual review of physiology* 59: 437-455, 1997.
19. **Cai Q, Michea L, Andrews P, Zhang Z, Rocha G, Dmitrieva N, and Burg MB.** Rate of increase of osmolality determines osmotic tolerance of mouse inner medullary epithelial cells. *American journal of physiology Renal physiology* 283: F792-798, 2002.
20. **Chi X, Zhao X, Wang W, Niu Y, Cheng M, Liu X, Cui S, and Yang W.** Fusion expression of Occludin extracellular loops and an alpha-helical bundle: A new research model for tight junction. *PloS one* 12: e0175516, 2017.
21. **Clapp WL, Madsen KM, Verlander JW, and Tisher CC.** Intercalated cells of the rat inner medullary collecting duct. *Kidney international* 31: 1080-1087, 1987.
22. **Coleman RA, Wu DC, Liu J, and Wade JB.** Expression of aquaporins in the renal connecting tubule. *American journal of physiology Renal physiology* 279: F874-883, 2000.
23. **Dantzer WH, Layton AT, Layton HE, and Pannabecker TL.** Urine-concentrating mechanism in the inner medulla: function of the thin limbs of the loops of Henle. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 9: 1781-1789, 2014.
24. **Dechant A.** Temperaturabhängigkeit <http://www.ph-redox.leitwert.de/medien/dokumente/Temperaturabhaengigkeit.pdf> [28.03., 2016].

25. **Di Ciano C, Nie Z, Szaszi K, Lewis A, Uruno T, Zhan X, Rotstein OD, Mak A, and Kapus A.** Osmotic stress-induced remodeling of the cortical cytoskeleton. *American journal of physiology Cell physiology* 283: C850-865, 2002.
26. **Dieterich HJ, Barrett JM, Kriz W, and Bulhoff JP.** The ultrastructure of the thin loop limbs of the mouse kidney. *Anatomy and embryology* 147: 1-18, 1975.
27. **Dietrich A, Mathia S, Kaminski H, Mutig K, Rosenberger C, Mrowka R, Bachmann S, and Paliege A.** Chronic activation of vasopressin V2 receptor signalling lowers renal medullary oxygen levels in rats. *Acta physiologica* 207: 721-731, 2013.
28. **Dmitrieva NI, Cai Q, and Burg MB.** Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 2317-2322, 2004.
29. **Ferraris JD, and Burg MB.** Tonicity-dependent regulation of osmoprotective genes in mammalian cells. *Contributions to nephrology* 152: 125-141, 2006.
30. **Frindt G, Ergonul Z, and Palmer LG.** Na channel expression and activity in the medullary collecting duct of rat kidney. *American journal of physiology Renal physiology* 292: F1190-1196, 2007.
31. **Fulghum LJ.** EVOM or Volt Meter: Defining the Difference. *WPI Talk Science Block*. <https://www.wpiinc.com/blog/2013/04/24/product-information/evom-or-volt-meter-defining-the-difference/>. [17.03., 2015].
32. **Gil MC, Aguirre JA, Lemoine AP, Segura ET, Barontini M, and Armando I.** Influence of age on stress responses to metabolic cage housing in rats. *Cellular and molecular neurobiology* 19: 625-633, 1999.
33. **Gong Y, Renigunta V, Himmerkus N, Zhang J, Renigunta A, Bleich M, and Hou J.** Claudin-14 regulates renal Ca(+) transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway. *The EMBO journal* 31: 1999-2012, 2012.
34. **Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, Islas S, Valencia L, Muriel P, Ponce L, and Reyes JL.** Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney international* 57: 2386-2402, 2000.
35. **Greger R.** Cation selectivity of the isolated perfused cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 390: 30-37, 1981.
36. **Grenier FC.** Characteristics of renal collecting tubule cells in primary culture. *Mineral and electrolyte metabolism* 12: 58-63, 1986.
37. **Grupp C, Begher M, Cohen D, Raghunath M, Franz HE, and Muller GA.** Isolation

and characterization of the lower portion of the thin limb of Henle in primary culture. *The American journal of physiology* 274: F775-782, 1998.

38. **Gunzel D, Amasheh S, Pfaffenbach S, Richter JF, Kausalya PJ, Hunziker W, and Fromm M.** Claudin-16 affects transcellular Cl⁻ secretion in MDCK cells. *The Journal of physiology* 587: 3777-3793, 2009.

39. **Gunzel D, Stuiver M, Kausalya PJ, Haisch L, Krug SM, Rosenthal R, Meij IC, Hunziker W, Fromm M, and Muller D.** Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *Journal of cell science* 122: 1507-1517, 2009.

40. **Gunzel D, and Yu AS.** Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological reviews* 93: 525-569, 2013.

41. **Himmerkus N, Plain A, Marques RD, Sonntag SR, Paliege A, Leipziger J, and Bleich M.** AVP dynamically increases paracellular Na⁺ permeability and transcellular NaCl transport in the medullary thick ascending limb of Henle's loop. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 469: 149-158, 2017.

42. **Hogg RJ, and Kokko JP.** Comparison between the electrical potential profile and the chloride gradients in the thin limbs of Henle's loop in rats. *Kidney international* 14: 428-436, 1978.

43. **Hoorn EJ, Nelson JH, McCormick JA, and Ellison DH.** The WNK kinase network regulating sodium, potassium, and blood pressure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22: 605-614, 2011.

44. **Hou J, Gomes AS, Paul DL, and Goodenough DA.** Study of claudin function by RNA interference. *The Journal of biological chemistry* 281: 36117-36123, 2006.

45. **Hou J, Paul DL, and Goodenough DA.** Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *Journal of cell science* 118: 5109-5118, 2005.

46. **Hou J, Rajagopal M, and Yu AS.** Claudins and the kidney. *Annual review of physiology* 75: 479-501, 2013.

47. **Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S, and Goodenough DA.** Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 15350-15355, 2009.

48. **Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, Waldegger S, and Goodenough DA.** Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *The Journal of clinical investigation* 118: 619-628, 2008.

49. **Hou J, Renigunta A, Yang J, and Waldegger S.** Claudin-4 forms paracellular chloride

channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 18010-18015, 2010.

50. **Husted RF, Hayashi M, and Stokes JB.** Characteristics of papillary collecting duct cells in primary culture. *The American journal of physiology* 255: F1160-1169, 1988.

51. **Husted RF, Laplace JR, and Stokes JB.** Enhancement of Electrogenic Na⁺ Transport across Rat Inner Medullary Collecting Duct by Glucocorticoid and by Mineralocorticoid Hormones. *Journal of Clinical Investigation* 86: 498-506, 1990.

52. **Ikari A, Matsumoto S, Harada H, Takagi K, Hayashi H, Suzuki Y, Degawa M, and Miwa M.** Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *Journal of cell science* 119: 1781-1789, 2006.

53. **Imai M, Taniguchi J, and Yoshitomi K.** Transition of permeability properties along the descending limb of long-loop nephron. *The American journal of physiology* 254: F323-328, 1988.

54. **Inai T, Sengoku A, Guan X, Hirose E, Iida H, and Shibata Y.** Heterogeneity in expression and subcellular localization of tight junction proteins, claudin-10 and -15, examined by RT-PCR and immunofluorescence microscopy. *Archives of histology and cytology* 68: 349-360, 2005.

55. **Kato A, Klein JD, Zhang C, and Sands JM.** Angiotensin II increases vasopressin-stimulated facilitated urea permeability in rat terminal IMCDs. *American journal of physiology Renal physiology* 279: F835-840, 2000.

56. **Kimizuka H, and Koketsu K.** Ion transport through cell membrane. *Journal of theoretical biology* 6: 290-305, 1964.

57. **Klinke RS, S.** *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003.

58. **Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, Vitzthum H, Suzuki Y, Luk JM, Becker C, Schlingmann KP, Schmid M, Rodriguez-Soriano J, Ariceta G, Cano F, Enriquez R, Juppner H, Bakkaloglu SA, Hediger MA, Gallati S, Neuhauss SC, Nurnberg P, and Weber S.** Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *American journal of human genetics* 79: 949-957, 2006.

59. **Kortenoeven ML, Pedersen NB, Rosenbaek LL, and Fenton RA.** Vasopressin regulation of sodium transport in the distal nephron and collecting duct. *American journal of physiology Renal physiology* 309: F280-299, 2015.

60. **Lanaspa MA, Andres-Hernando A, Rivard CJ, Dai Y, and Berl T.** Hypertonic stress increases claudin-4 expression and tight junction integrity in association with MUPP1 in

IMCD3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 15797-15802, 2008.

61. **Le Moellic C, Boulkroun S, Gonzalez-Nunez D, Dublineau I, Cluzeaud F, Fay M, Blot-Chabaud M, and Farman N.** Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells. *American journal of physiology Cell physiology* 289: C1513-1521, 2005.

62. **Li H, Sheppard DN, and Hug MJ.** Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 3 Suppl 2: 123-126, 2004.

63. **Li J, Li YX, Chen MH, Li J, Du J, Shen B, and Xia XM.** Changes in the phosphorylation of claudins during the course of experimental colitis. *International journal of clinical and experimental pathology* 8: 12225-12233, 2015.

64. **Lim SW, Ahn KO, Sheen MR, Jeon US, Kim J, Yang CW, and Kwon HM.** Downregulation of renal sodium transporters and tonicity-responsive enhancer binding protein by long-term treatment with cyclosporin A. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18: 421-429, 2007.

65. **Lim SW, Han KH, Jung JY, Kim WY, Yang CW, Sands JM, Knepper MA, Madsen KM, and Kim J.** Ultrastructural localization of UT-A and UT-B in rat kidneys with different hydration status. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 290: R479-492, 2006.

66. **Liu BC, Song X, Lu XY, Fang CZ, Wei SP, Alli AA, Eaton DC, Shen BZ, Li XQ, and Ma HP.** Lovastatin attenuates effects of cyclosporine A on tight junctions and apoptosis in cultured cortical collecting duct principal cells. *American journal of physiology Renal physiology* 305: F304-313, 2013.

67. **Liu W, Morimoto T, Kondo Y, Iinuma K, Uchida S, Sasaki S, Marumo F, and Imai M.** Analysis of NaCl transport in thin ascending limb of Henle's loop in CLC-K1 null mice. *American journal of physiology Renal physiology* 282: F451-457, 2002.

68. **Lüllmann-Rauch R.** *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Georg Theme Vera KG, 2009.

69. **Maric K, Oksche A, and Rosenthal W.** Aquaporin-2 expression in primary cultured rat inner medullary collecting duct cells. *The American journal of physiology* 275: F796-801, 1998.

70. **Milatz S, and Breiderhoff T.** One gene, two paracellular ion channels-claudin-10 in the kidney. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 469: 115-121, 2017.

71. **Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Gunzel D, Muller D, Schulzke JD, Amasheh S, and Fromm M.** Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochimica et biophysica acta* 1798: 2048-2057, 2010.
72. **Mutig K, Saritas T, Uchida S, Kahl T, Borowski T, Paliege A, Bohlick A, Bleich M, Shan Q, and Bachmann S.** Short-term stimulation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation. *American journal of physiology Renal physiology* 298: F502-509, 2010.
73. **Muto S, Hata M, Taniguchi J, Tsuruoka S, Moriwaki K, Saitou M, Furuse K, Sasaki H, Fujimura A, Imai M, Kusano E, Tsukita S, and Furuse M.** Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 8011-8016, 2010.
74. **Nakayama Y, Peng T, Sands JM, and Bagnasco SM.** The TonE/TonEBP pathway mediates tonicity-responsive regulation of UT-A urea transporter expression. *The Journal of biological chemistry* 275: 38275-38280, 2000.
75. **Nawata CM, Dantzler WH, and Pannabecker TL.** Gene expression in the thin limbs of Henle of the waterrestricted rat. *Faseb J* 27: no. 1 Supplement 1111.1115, 2013.
76. **Nawata CM, Evans KK, Dantzler WH, and Pannabecker TL.** Transepithelial water and urea permeabilities of isolated perfused Munich-Wistar rat inner medullary thin limbs of Henle's loop. *American journal of physiology Renal physiology* 306: F123-129, 2014.
77. **Ng B, and Barry PH.** The measurement of ionic conductivities and mobilities of certain less common organic ions needed for junction potential corrections in electrophysiology. *Journal of neuroscience methods* 56: 37-41, 1995.
78. **Pannabecker TL, Abbott DE, and Dantzler WH.** Three-dimensional functional reconstruction of inner medullary thin limbs of Henle's loop. *American journal of physiology Renal physiology* 286: F38-45, 2004.
79. **Pannabecker TL, Dahlmann A, Brokl OH, and Dantzler WH.** Mixed descending- and ascending-type thin limbs of Henle's loop in mammalian renal inner medulla. *American journal of physiology Renal physiology* 278: F202-208, 2000.
80. **Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, Kashlan OB, Deen PM, and Kohan DE.** Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 10: 135-146, 2015.
81. **Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Muller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, and Blasig IE.** Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction

between classic claudins. *Faseb J* 22: 146-158, 2008.

82. **Plain Reyes A.** 2015. Regulation of the tight junction permeabilities in the TAL. *Medizinische Dissertation CAU Kiel, Kiel* http://macau.uni-kiel.de/servlets/MCRFileNodeServlet/dissertation_derivate_00006387/20151228_Thesis_All_ein.pdf: 2015.
83. **Riethmuller C, Oberleithner H, Wilhelmi M, Franz J, Schlatter E, Klokkers J, and Edemir B.** Translocation of aquaporin-containing vesicles to the plasma membrane is facilitated by actomyosin relaxation. *Biophysical journal* 94: 671-678, 2008.
84. **Rinschen MM, Klokkers J, Pavenstadt H, Neugebauer U, Schlatter E, and Edemir B.** Different effects of CsA and FK506 on aquaporin-2 abundance in rat primary cultured collecting duct cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 462: 611-622, 2011.
85. **Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Gunzel D, and Fromm M.** Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *Journal of cell science* 123: 1913-1921, 2010.
86. **Rozansky DJ, Cornwall T, Subramanya AR, Rogers S, Yang YF, David LL, Zhu X, Yang CL, and Ellison DH.** Aldosterone mediates activation of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter through an SGK1 and WNK4 signaling pathway. *The Journal of clinical investigation* 119: 2601-2612, 2009.
87. **Ruhfus B, Bauernschmitt HG, and Kinne RK.** Properties of a polarized primary culture from rat renal inner medullary collecting duct (IMCD) cells. *In vitro cellular & developmental biology Animal* 34: 227-231, 1998.
88. **Ruhlmann A, and Nordheim A.** Effects of the immunosuppressive drugs CsA and FK506 on intracellular signalling and gene regulation. *Immunobiology* 198: 192-206, 1997.
89. **Runggaldier D, Pradas LG, Neckel PH, Mack AF, Hirt B, and Gleiser C.** Claudin expression in the rat endolymphatic duct and sac - first insights into regulation of the paracellular barrier by vasopressin. *Scientific reports* 7: 2017.
90. **Schenk LK, Rinschen MM, Klokkers J, Kurian SM, Neugebauer U, Salomon DR, Pavenstaedt H, Schlatter E, and Edemir B.** Cyclosporin-A induced toxicity in rat renal collecting duct cells: interference with enhanced hypertonicity induced apoptosis. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 26: 887-900, 2010.
91. **Schlatter E, and Schafer JA.** Electrophysiological studies in principal cells of rat cortical collecting tubules. ADH increases the apical membrane Na⁺-conductance. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 409: 81-92, 1987.

92. **Seidel S, Neymeyer H, Kahl T, Roschel T, Mutig K, Flower R, Schnermann J, Bachmann S, and Paliege A.** Annexin A1 modulates macula densa function by inhibiting cyclooxygenase 2. *American journal of physiology Renal physiology* 303: F845-854, 2012.
93. **Shan Q, Himmerkus N, Hou J, Goodenough DA, and Bleich M.** Insights into driving forces and paracellular permeability from claudin-16 knockdown mouse. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165: 148-151, 2009.
94. **Sheikh-Hamad D, Nadkarni V, Choi YJ, Truong LD, Wideman C, Hodjati R, and Gabbay KH.** Cyclosporine A inhibits the adaptive responses to hypertonicity: a potential mechanism of nephrotoxicity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12: 2732-2741, 2001.
95. **Shinoda T, Shinya N, Ito K, Ohsawa N, Terada T, Hirata K, Kawano Y, Yamamoto M, Kimura-Someya T, Yokoyama S, and Shirouzu M.** Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by an enterotoxin. *Scientific reports* 6: 33632, 2016.
96. **Silbernagel SD, A.** *Taschenatlas Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2007.
97. **Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, and Lifton RP.** Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285: 103-106, 1999.
98. **Stokes JB.** Sodium and potassium transport by the collecting duct. *Kidney international* 38: 679-686, 1990.
99. **Stokes JB, Grupp C, and Kinne RK.** Purification of rat papillary collecting duct cells: functional and metabolic assessment. *The American journal of physiology* 253: F251-262, 1987.
100. **Sugawara N, Morimoto T, Farajov EI, Kumagai N, Aslanova UF, Rai T, Uchida S, Sasaki S, Tsuchiya S, and Kondo Y.** Calcium and calcimimetics regulate paracellular Na⁺ transport in the thin ascending limb of Henle's loop in mouse kidney. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 460: 197-205, 2010.
101. **Suzuki H, Nishizawa T, Tani K, Yamazaki Y, Tamura A, Ishitani R, Dohmae N, Tsukita S, Nureki O, and Fujiyoshi Y.** Crystal Structure of a Claudin Provides Insight into the Architecture of Tight Junctions. *Science* 344: 304-307, 2014.
102. **Takahashi N, Kondo Y, Ito O, Igarashi Y, Omata K, and Abe K.** Vasopressin stimulates Cl⁻ transport in ascending thin limb of Henle's loop in hamster. *The Journal of clinical investigation* 95: 1623-1627, 1995.

103. **Tatum R, Zhang Y, Salleng K, Lu Z, Lin JJ, Lu Q, Jeanson BG, Ding L, and Chen YH.** Renal salt wasting and chronic dehydration in claudin-7-deficient mice. *American journal of physiology Renal physiology* 298: F24-34, 2010.
104. **Van Itallie C, Rahner C, and Anderson JM.** Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *The Journal of clinical investigation* 107: 1319-1327, 2001.
105. **Van Itallie CM, and Anderson JM.** Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Seminars in cell & developmental biology* 36: 157-165, 2014.
106. **Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, and Anderson JM.** Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *American journal of physiology Renal physiology* 291: F1288-1299, 2006.
107. **Wade JB, Lee AJ, Liu J, Ecelbarger CA, Mitchell C, Bradford AD, Terris J, Kim GH, and Knepper MA.** UT-A2: a 55-kDa urea transporter in thin descending limb whose abundance is regulated by vasopressin. *American journal of physiology Renal physiology* 278: F52-62, 2000.
108. **Wang J, Zhang ZR, Chou CF, Liang YY, Gu Y, and Ma HP.** Cyclosporine stimulates the renal epithelial sodium channel by elevating cholesterol. *American journal of physiology Renal physiology* 296: F284-290, 2009.
109. **Wang Y, Klein JD, Liedtke CM, and Sands JM.** Protein kinase C regulates urea permeability in the rat inner medullary collecting duct. *American journal of physiology Renal physiology* 299: F1401-1406, 2010.
110. **Weber S, Schlingmann KP, Peters M, Nejsum LN, Nielsen S, Engel H, Grzeschik KH, Seyberth HW, Grone HJ, Nusing R, and Konrad M.** Primary gene structure and expression studies of rodent paracellin-1. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12: 2664-2672, 2001.
111. **Will C, Breiderhoff T, Thumfart J, Stuiver M, Kopplin K, Sommer K, Gunzel D, Querfeld U, Meij IC, Shan Q, Bleich M, Willnow TE, and Muller D.** Targeted deletion of murine Cldn16 identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca²⁺ and Mg²⁺ wasting. *American journal of physiology Renal physiology* 298: F1152-1161, 2010.
112. **Wu J, Gerstandt K, Zhang H, Liu J, and Hinds BJ.** Electrophoretically induced aqueous flow through single-walled carbon nanotube membranes. *Nature nanotechnology* 7: 133-139, 2012.
113. **Yamaguchi T, Wallace DP, Magenheimer BS, Hempson SJ, Grantham JJ, and Calvet JP.** Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching

cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype. *Journal of Biological Chemistry* 279: 40419-40430, 2004.

114. **Yu AS.** Claudins and the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 26: 11-19, 2015.

115. **Yu AS, Cheng MH, Angelow S, Gunzel D, Kanzawa SA, Schneeberger EE, Fromm M, and Coalson RD.** Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *The Journal of general physiology* 133: 111-127, 2009.

116. **Yu AS, Enck AH, Lencer WI, and Schneeberger EE.** Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *The Journal of biological chemistry* 278: 17350-17359, 2003.

117. **Zhang Z, Dmitrieva NI, Park JH, Levine RL, and Burg MB.** High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9491-9496, 2004.

7 Anhang

7.1 Tierversuchsantrag

Die Tötung von Tieren zur Organentnahme wurde beim Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume (MELUR) des Landes Schleswig-Holstein angezeigt und von diesem unter der Nummer V 312-7224.121-2 genehmigt.

Der Versuch zu den verschiedenen Diuresezuständen wurde als Tierversuchsvorhaben „Die Tight Junctions im inneren Mark der Niere“ mit der Nummer V 312-7224.121-2 (38-2/12) vom MELUR genehmigt.

8 Danksagung

Als erstes danke ich meiner Betreuerin Dr. med. Nina Himmerkus und meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Markus Bleich für Ihre großartige Unterstützung während meiner Doktorarbeit. Ich hatte nicht nur die große Freude mit Ihnen experimentell zusammen am Tierversuch zu arbeiten, sondern wurde auch jederzeit von Ihnen sowohl in menschlicher als auch fachlicher Hinsicht unterstützt.

Ebenfalls danken möchte ich den anderen Mitgliedern der AG Bleich, die ein hervorragendes Team sind und für Fragen jederzeit zur Verfügung standen. Mein Dank geht hier insbesondere an Annalisa Ziemens für die großartige Einarbeitung und an Dipl. biol. Sandra Grüssel für die Hilfe bezüglich der Zellkulturen.

Ein weiterer Dank geht an Dr. med. Alexander Paliege für die zur Verfügungstellung der Nierenschnitte sowie an Prof. Dr. rer. nat. Dorothee Günzel für die Gabe zahlreicher Antikörper.

Nicht vergessen möchte ich auch Charlotte Baum und das Team des Victor-Hensen-Hauses. Ohne Ihre großartige Unterstützung und die tolle Kommunikation wäre die Durchführung des Tierversuches nicht möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für Ihr offenes Ohr und Ihre Unterstützung während aller Phasen meiner Doktorarbeit danken!