

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

# **DER PARAZELLULÄRE WEG DES PROXIMALEN TUBULUS**

-

## **UNTERSUCHUNGEN REGULATIVER VORGÄNGE ZUR AUFRECHTERHALTUNG DER KALZIUMHOMÖOSTASE**

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

vorgelegt von

**ADRIAN KLIETZ**

aus Demmin

Kiel 2018

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Markus Bleich, Physiologisches Institut
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Thorsten Feldkamp, Klinik für Innere Medizin IV mit den Schwerpunkten Nieren- und Hochdruckkrankheiten
Tag der mündlichen Prüfung:	28.11.2019
Zum Druck genehmigt:	Kiel, den 12.09.2019

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Epithelialer Transport.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Schlussleisten.....</b>	<b>1</b>
1.2.1 Aufbau und Funktion von Tight junctions .....	1
1.2.2 Claudine.....	2
<b>1.3 Aufbau und Funktion des proximalen Tubulus.....</b>	<b>3</b>
1.3.1 Claudin Expression im proximalen Tubulus.....	6
<b>1.4 Die Kalziumhomöostase .....</b>	<b>8</b>
1.4.1 Tubulärer Kalziumtransport .....	8
1.4.2 Regulation des renalen Kalziumtransportes .....	9
<b>1.5 Mechanismen zur Regulation der Proteinfunktion.....</b>	<b>11</b>
<b>1.6 Bestehende Zelllinien des proximalen Tubulus .....</b>	<b>13</b>
<b>1.7 Zielsetzung.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Chemikalien.....	15
2.1.2 Versuchstiere .....	15
2.1.3 Lösungen und Reagenzien.....	16
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.2.1 Präparation von Tubulussegmenten .....	23
2.2.2 Zellkultur .....	26
2.2.3 Elektrophysiologie.....	28
2.2.4 Analyse der Claudin Expression mittels semiquantitativer RT-PCR .....	36
2.2.5 Analyse der Claudin Expression auf Proteinebene.....	44
<b>2.3 Datenanalyse .....</b>	<b>49</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1 Analyse der parazellulären Eigenschaften nativer proximaler Tubuli.....</b>	<b>50</b>
3.1.1 Tubulusperfusion .....	50

3.1.2	Semiquantitative RT-PCR.....	53
<b>3.2</b>	<b>Regulation des parazellulären Weges unter Diät .....</b>	<b>55</b>
3.2.1	Semiquantitative Expressionsanalyse mittels RT-PCR.....	56
3.2.2	Semiquantitative Expressionsanalyse mittels Western Blot .....	59
3.2.3	Immunfluoreszenzanalysen .....	60
<b>3.3</b>	<b>Primärzellkultur .....</b>	<b>63</b>
3.3.1	Eigenschaften der Primärzellkultur .....	67
3.3.2	Einfluss einer erhöhten Kalziumkonzentration auf die Eigenschaften der Primärzellkultur .....	72
3.3.3	Effekt von Co-Kultivierung auf die Primärzellkultur .....	75
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodik .....</b>	<b>80</b>
4.1.1	Versuchstiere .....	80
4.1.2	Elektrophysiologische Analysen mittels isolierter Perfusion oder Ussing-Kammer .....	80
4.1.3	Expressionsanalysen.....	85
<b>4.2</b>	<b>Eigenschaften des parazellulären Weges des proximalen Tubulus.....</b>	<b>87</b>
4.2.1	Parazelluläre Eigenschaften des nativen proximalen Tubulus .....	87
4.2.2	Expressionsanalysen im Diätversuch.....	91
<b>4.3</b>	<b>Die Primärzellkultur als Modell des nativen proximalen Tubulus .....</b>	<b>93</b>
<b>4.4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>95</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>96</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>108</b>
8.1	Geräte .....	108
8.2	Tierversuchsantrag.....	108
	<b>Danksagung .....</b>	<b>109</b>
	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>110</b>
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>111</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon, Vasopressin
AUC	<i>engl.: area under the curve</i> Fläche unter dem Graphen
bp	Basenpaare
BSA	<i>engl.: bovine serum albumin</i> Rinderserum-Albumin
CaSR	<i>engl.: calcium sensing receptor</i> Kalziumsensitiver Rezeptor
cDNA	<i>engl.: complementary desoxyribonucleic acid</i> Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C <sub>q</sub>	<i>engl.: Cycle of quantification</i> Zyklus der Quantifizierung
DMEM	<i>engl.: Dulbeccos modified eagles medium</i> Modifiziertes Eagle Medium
Eif3f	<i>engl.: eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F</i> Untereinheit F vom eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor 3
ENaC	<i>engl.: epithelial sodium channel</i> Epithelialer Natriumkanal
EVOM	<i>engl.: Epithelial Volt-Ohm-Meter</i> Gerät zur Messung von Spannung und Widerstand in Epithelien
FACS	<i>engl.: fluorescence activated cell sorting</i> Durchflusszytometrie
FE	Fraktionelle Exkretion
FGF-23	<i>engl.: fibroblast growth factor 23</i> Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23
I <sub>Injection</sub>	<i>engl.: injection current</i> Injektionsstrom
IM	<i>engl.: inner medulla</i> Inneres Nierenmark
I <sub>sc</sub>	<i>engl.: short circuit current</i> Kurzschlussstrom

ISOM	<i>engl.: inner stripe of outer medulla</i> Innenstreifen des äußeren Nierenmarkes
KO	<i>engl.: knock out</i> Induzierter DNA Defekt mit selektivem Verlust eines Proteins
MDCK	<i>engl.: madin darby canine kidney</i> Immortalisierte Zelllinie tubulären Ursprungs vom Cocker Spaniel
mRNA	<i>engl.: messenger ribonucleic acid</i> Boten-Ribonukleinsäure
miRNA	<i>engl.: micro ribonucleic acid</i> Mikro-Ribonukleinsäure
mpPTEC	<i>engl.: murine primary proximal tubule epithelial cells</i> Primäre murine epitheliale proximale Tubuluszellen
NRTC	<i>engl.: no reverse transcriptase control</i> Kontrollversuch ohne Zusatz einer reversen Transkriptase
NTC	<i>engl.: no template control</i> Kontrollversuch ohne Zusatz von cDNA
OM	<i>engl.: outer medulla</i> Äußeres Nierenmark
OSOM	<i>engl.: outer stripe of outer medulla</i> Außenstreifen des äußeren Nierenmarkes
PBS	<i>engl.: phosphate buffered saline</i> Phosphat gepufferte Salzlösung
PCT	<i>engl.: proximal convoluted tubule</i> Gewundener proximaler Tubulus
PFA	Paraformaldehyd
PST	<i>engl.: proximal straight tubule</i> Gerader proximaler Tubulus
PTH	Parathormon
rRNA	<i>engl.: ribosomal ribonucleic acid</i> Ribosomale Ribonukleinsäuren

rpm	<i>engl.: rounds per minute</i> Umdrehungen pro Minute
R <sub>te</sub>	<i>engl.: transepithelial resistance</i> Transepithelialer Widerstand
RT-PCR	<i>engl.: Real-Time-PCR</i> Echtzeit-PCR
SGLT	<i>engl.: sodium dependent glucose transporter</i> Natrium gekoppelter Glucosetransporter
SPE	<i>engl.: sodium potassium exchanger</i> Natrium-Kalium-ATPase
TAL	<i>engl.: thick ascending limb</i> Dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife
TJ	<i>engl.: tight junction</i> Dichte Verbindung / Schlussleisten
TMD	Transmembrandomäne
tRNA	<i>engl.: transfer ribonucleic acid</i> Transfer-Ribonukleinsäuren
TRPV5	<i>engl.: transient receptor potential cation channel subfamily V member 5</i> Kationenkanal der TRP-Rezeptorfamilie mit Kalziumpermeabilität
V <sub>LJ</sub>	<i>engl.: liquid junction potential</i> Elektrische Spannung an Flüssigkeitsgrenzflächen
V <sub>PD</sub>	<i>engl.: diffusion potential</i> Diffusionspotential
V <sub>te</sub>	<i>engl.: transepithelial voltage</i> Transepitheliale Spannung
WT	Wildtyp

# 1. Einleitung

## 1.1 Epithelialer Transport

Epithelien sind Zellverbände an Grenzflächen unterschiedlicher Kompartimente eines Organismus. Die Funktion eines Epithels scheint dabei zunächst paradox. Zum Schutz des Individuums dient es vor allem als impermeable Barriere für toxische Substanzen und pathogene Erreger. Als wichtiger Knotenpunkt zur Umwelt erfolgt jedoch ein reger Austausch von Substraten und Stoffwechselendprodukten [1, 2]. Die Transportprozesse entlang eines Epithels unterliegen einer starken Selektivität und werden durch den Organismus vielschichtig reguliert. Grundsätzlich können diese Transportprozesse auf transzellulärem (durch die Epithelzelle) oder parazellulärem Weg (zwischen den Epithelzellen) erfolgen. Gasförmige und lipophile Stoffe können die Phospholipidmembran der Zellen passiv überwinden und verteilen sich daher entlang ihres Diffusionsgradienten. Hydrophile Stoffe und Ionen werden durch die Plasmamembran im jeweiligen Kompartiment zurückgehalten und bedürfen spezifischer Transportproteine oder Kanäle. Als wesentliche Triebkräfte dienen dabei chemische (Konzentrationsunterschiede) und elektrische (Membranpotential) Gradienten über die jeweilige Plasmamembran. Transzelluläre Transportprozesse sind unter Verbrauch energiereicher Verbindungen wie Adenosintriphosphat hingegen auch gegen elektrochemische Gradienten möglich. Für den parazellulären Transport spielen Zell-Zell Kontakte eine wesentliche Rolle. Zu diesen Zell-Zell Kontakten zählen Adherens junctions, Tight junctions (TJ), Desmosomen und Gap junctions. Sie sichern den mechanischen Kontakt und die Kommunikation zwischen epithelialen Zellen.

## 1.2 Schlussleisten

### 1.2.1 Aufbau und Funktion von Tight junctions

Tight junctions sind gürtelförmige Proteinstränge zwischen benachbarten Epithelzellen [3, 4]. An ihrer Zusammensetzung sind Claudine, Occludin, Tricellulin und JAMs (*engl.: junctional adhesion molecules*) beteiligt. Sie sind über Adapterproteine mit dem Aktinskelett der Epithelzelle verbunden und somit in der Zellmembran fixiert. Die Mobilität von Membranproteinen in der Plasmamembran ist durch die TJs limitiert. Dies ist Voraussetzung für eine Polarisierung von epithelialen Zellen über asymmetrischen Besatz von Proteinen in der Zellmembran. Die



einzelnen Pole der Epithelzelle werden dabei als luminales sowie basolaterales Kompartiment bezeichnet. Zudem bilden TJs eine parazelluläre Barriere zwischen benachbarten Epithelzellen aus. Diese Barriere kann, je nach Zusammensetzung der TJ, völlig dicht oder äußerst durchlässig sein und die parazellulären Eigenschaften eines Epithels somit maßgeblich beeinflussen.

### 1.2.2 Claudine

Als wesentliche Determinanten der parazellulären Eigenschaften von TJs gelten die Claudine. In Säugetier-Organismen wurden bisher 27 verschiedene Proteine dieser Proteinfamilie identifiziert. Sie zeichnen sich durch einen uniformen Aufbau mit vier Transmembran-Domänen, zwei extrazellulären Schleifen sowie zytosolischen C- und N-Termini aus (Abbildung 1) [5].

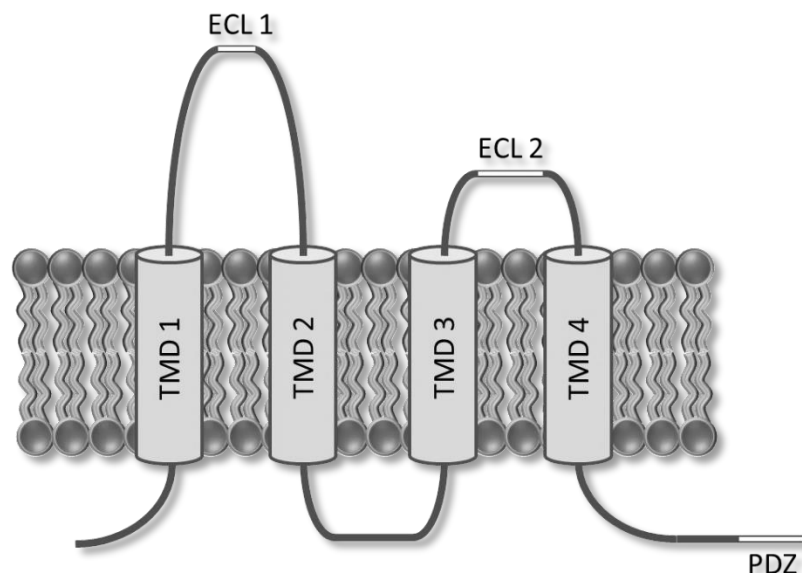


Abbildung 1

Struktureller Aufbau eines Claudins.

Vier Transmembrandomänen (TMD) durchspannen die Plasmamembran. Zwei extrazelluläre Schleifen (ECL) mit funktioneller Bedeutung liegen im Interzellularspalt. N- und C-terminales Ende mit fakultativer C-terminaler PDZ-Domäne liegen intrazellulär.

Die erste extrazelluläre Schleife ist für die parazellulären Eigenschaften von besonderer Bedeutung. Sie bestimmt die Permeabilität der parazellulären Barriere für Anionen und Kationen durch den Gehalt an geladenen Aminosäuren. Für die Interaktion von Claudinen benachbarter Zellen (Trans-Interaktion) scheint die zweite extrazelluläre Schleife wichtig zu sein. Einige Claudine weisen zudem eine C-terminale PDZ-Domäne auf. Diese Domäne dient der Interaktion mit

Zellstrukturproteinen und der Verankerung in der Zellmembran. Neben den Interaktionen von Claudinen benachbarter Zellen, treten auch Interaktionen von Claudinen einer Zelle in der Plasmamembran auf (Cis-Interaktion). Claudine sind somit funktionell niemals isoliert zu betrachten, da das parazelluläre Maschenwerk epithelialer Zellen eine Vielzahl von Interaktionen zwischen exprimierten Claudinen ermöglicht.

Zum einfacheren Verständnis erfolgt häufig eine Kategorisierung von Claudinen anhand ihrer Auswirkung auf die Eigenschaften der parazellulären Barriere. So werden „abdichtende“ von „porenbildenden“ Claudinen unterschieden. Letztere können weiterhin hinsichtlich ihrer Ionen- und Wasserpermeabilität stratifiziert werden [6]. Die Expression von Claudinen ist heterogen und abhängig vom untersuchten Gewebe. So zeigt sich auch in der Niere, je nach untersuchtem Tubulussegment, eine unterschiedliche Expression der Claudine (Abbildung 2) [7, 8]. Diese differenzielle Expression ist Basis der parazellulären Eigenschaften und abhängig von den jeweiligen Anforderungen an das entsprechende Epithel.

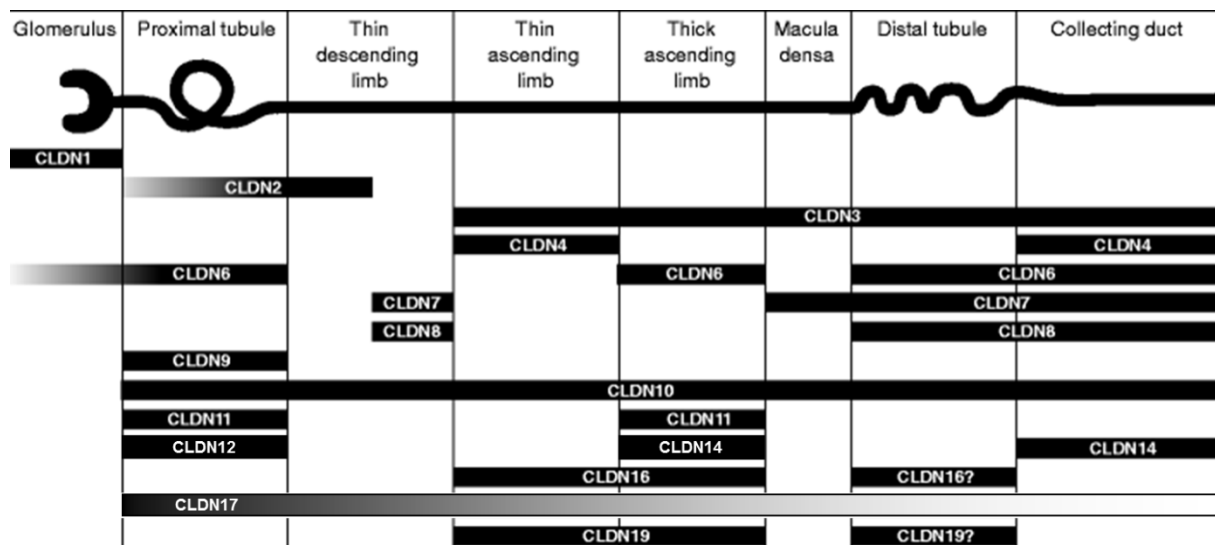


Abbildung 2  
Segmentspezifische Expression von Claudinen in der Niere.  
Abbildung modifiziert nach Günzel et al..

### 1.3 Aufbau und Funktion des proximalen Tubulus

Die Niere ist ein paariges Organ, das in seiner wesentlichen Organfunktion die Homöostase des extrazellulären Milieus gewährleistet. Neben der exkretorischen Funktion mit Aufrechterhaltung des Gleichgewichts für Wasser, Elektrolyte und pH-Wert, besitzt die Niere auch endokrine Funktionen im Rahmen des

Kalziumhaushaltes (Aktivierung von Vitamin D<sub>3</sub>), der Blutproduktion (Synthese von Erythropoetin) und des Blutdruckes (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System). Grundbaustein der Niere ist das Nephron. Funktionell kann das Nephron weiterhin in das Glomerulum und Tubulussystem differenziert werden. Im Glomerulum entsteht unter Anwendung eines effektiven Filtrationsdruckes ein Filtrat des Blutplasmas, welches Primärharn genannt wird. Die Zusammensetzung dieses Primärharns ist dabei im Wesentlichen von der Struktur des glomerulären Filters abhängig. Im weiteren Verlauf entlang des Tubulussystems erfolgt eine Modifizierung sowie Konzentrierung des initialen Filtrates. Nach Lokalisation sowie funktionellen Gesichtspunkten kann somit eine weitere Stratifizierung des Tubulussystems in Segmente und Subsegmente erfolgen (Abbildung 3).

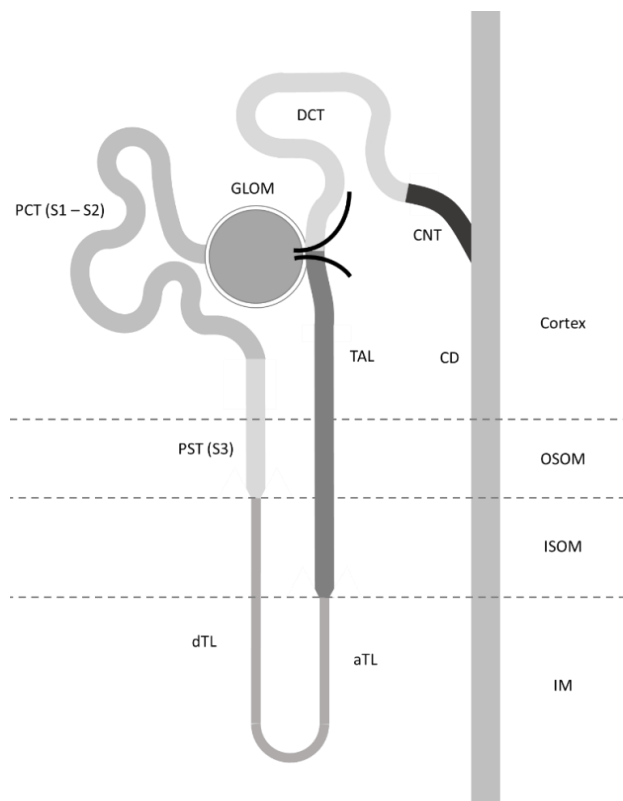


Abbildung 3

Schematische Darstellung eines juxtamedullären Nephrons (Abbildung modifiziert nach Plain et al). Im Glomerulum (GLOM) wird der Primärharn gebildet, welcher über ein angeschlossenes Tubulussystem modifiziert wird. In sequentieller Abfolge können gewundener (PCT) und gerader proximaler Tubulus (PST), dünner absteigender (dTL), dünner aufsteigender (aTL) und dicker aufsteigender (TAL) Teil der Henle-Schleife sowie der distale gewundene Tubulus (DCT), Verbindungstubulus (CNT) und Sammelrohr (CD) unterschieden werden. Die unterschiedlichen Anteile eines Nephrons können zudem den makroskopischen renalen Strukturen zugeordnet werden und erlauben somit eine Differenzierung in kortikale sowie juxtamedulläre Nephrene. Neben der Nierenrinde (Cortex) kann eine weitere Unterteilung des Nierenmarkes in inneres (IM) und äußeres Mark (OM) sowie dessen Innen- (ISOM) und Außenstreifen (OSOM) erfolgen.

Der proximale Tubulus schließt sich direkt an das Glomerulum an und soll hier in seiner Funktion näher erläutert werden. Anhand der Lage lassen sich drei spezifische Subsegmente (S1-S3) des proximalen Tubulus unterscheiden. Das S1 Segment befindet sich post-glomerulär im gebogenen Verlauf des proximalen Tubulus und geht nahtlos in das ebenfalls kortikal gelegene S2 Segment über. Das anschließende gerade S3 Segment reicht bis in den Außenstreifen des äußeren Markes. Hier grenzt es an den absteigenden dünnen Teil der Henle-Schleife. Mikroskopisch zeichnet sich der proximale Tubulus durch eine immense Vergrößerung der Zelloberfläche aus. Die luminale Membran ist durch einen Bürstensaum (Mikrovilli) vergrößert und bietet damit eine Oberfläche von 40-80 m<sup>2</sup>. Diese riesige Oberfläche ist Sitz vieler sekundär aktiver Transportproteine. Die basolaterale Membran weist ebenfalls starke Einfaltungen auf. Zytosolisch befindet sich hier eine Vielzahl von Mitochondrien in unmittelbarer Nähe zur primär aktiven Natrium-Kalium-ATPase. Entlang des proximalen Tubulus werden bereits circa 60% des primär filtrierten Wassers sowie Natriumchlorids resorbiert. Diese massive Resorption erfolgt zum einen über transepitheliale aber auch über parazelluläre Transportprozesse [2, 9]. Zu den wichtigsten transepithelialen Transportprozessen zählen die Natrium gekoppelten Symporter der luminalen Plasmamembran. Unter physiologischen Bedingungen sichern sie unter anderem die bis zu 99-prozentige Resorption von Glucose (SGLT1/2), eine bis zu 70-prozentige Resorption von Phosphat (NaPiIIa/b) sowie die bis zu 90-prozentige Resorption von Hydrogencarbonat (NHE3). Die elektrogenen, sekundär aktiven Transportprozesse führen im postglomerulären Teil des proximalen Tubulus zu einer leichten Depolarisation der luminalen Membran. Diese resultiert in einem lumennegativen transepithelialen Potential von bis zu -2 mV, welches die parazelluläre Resorption von Chlorid Ionen antreibt [10]. Neben der transzellulären Chloridresorption über Anionen-Austauscher folgen Chlorid Ionen so ihrem elektrochemischen Gradienten ins Interstitium. Die parazelluläre Resorption von Chlorid in Verbindung mit geringerem Substratangebot für elektrogene luminale Transportprozesse führt im späten proximalen Tubulus zu einem leicht lumenpositiven Potential von +2 mV. Es stellt die elektrische Triebkraft für die parazelluläre Resorption von Kationen. Die Resorption von Ionen generiert geringe osmotische Gradienten über das Epithel des proximalen Tubulus. Diese osmotischen Gradienten führen zu einer immensen Resorption von Wasser [2, 9]. Das Wasser wird dabei transzellulär über

Wasserporen (Aquaporin 1) oder parazellulär resorbiert. Auf parazellulärem Weg kann das Wasser zusätzliche Ionen mit sich ziehen und somit eine weitere Resorption von Elektrolyten ermöglichen. Dieses Phänomen wird als „solvent drag“ bezeichnet und steigert die Leistung der basolateral exprimierten Natrium-Kalium-ATPase von drei Natrium Ionen pro ATP auf bis zu zehn Natrium Ionen pro ATP (siehe Abbildung 4).

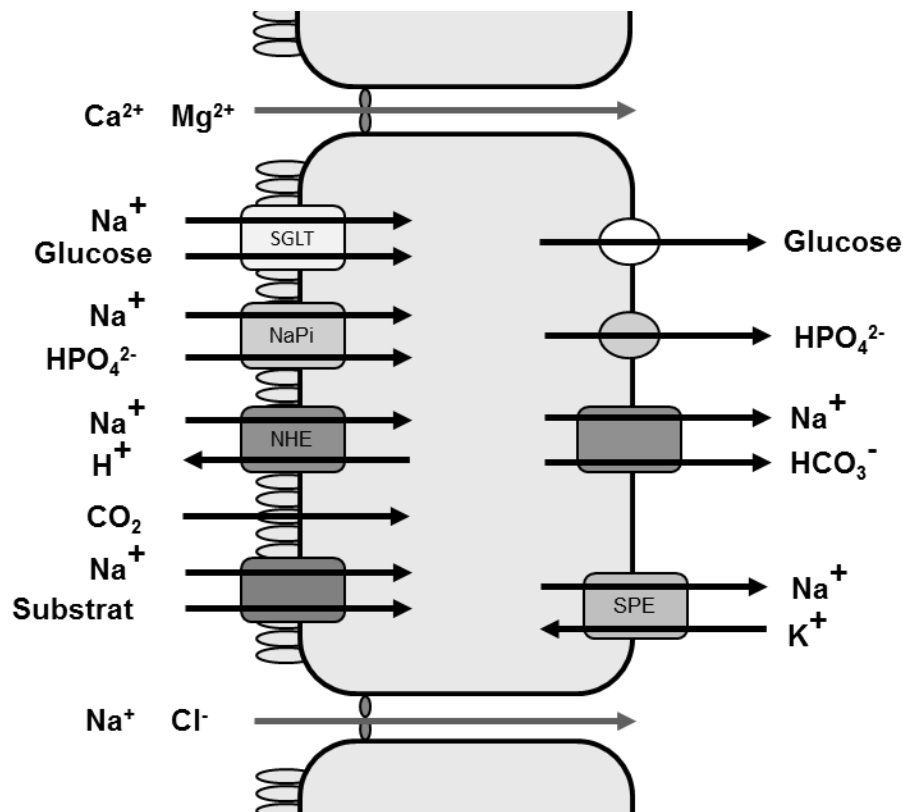


Abbildung 4

Schematische Darstellung des transepithelialen sowie parazellulären Transports im proximalen Tubulus.

Natrium gekoppelte Symporter für Glucose (SGLT), Phosphat (NaPi) und Aminosäuren depolarisieren die luminale Membran und führen im frühen proximalen Tubulus zu einem lumennegativen Potential, welches Chlorid Ionen über die parazelluläre Barriere treibt. Als wesentliche Triebkraft für die Natrium gekoppelten Symporter dient der elektrochemische Gradient über die luminale Membran, welcher durch die basolateral lokalisierte Natrium-Kalium-ATPase (SPE) generiert wird. Die Resorption von Hydrogencarbonat erfolgt unter Mitwirkung der Carboanhydrase und Sekretion von Protonen über einen Natrium gekoppelten Antiporter (NHE). Im späten proximalen Tubulus besteht durch überwiegende Chloridresorption ein lumenpositives transepitheliales Potential, welches die wesentliche Triebkraft für die parazelluläre Resorption von Kationen darstellt.

### 1.3.1 Claudin Expression im proximalen Tubulus

Die Expression der Claudine im proximalen Tubulus ist altersabhängig [11]. So konnten die Claudine 6 und 9 nur während der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden, während im Erwachsenenalter die Claudine 2, 10a, 11, 12 und 17

beschrieben sind. Im Folgenden sollen die Claudine des adulten proximalen Tubulus anhand wissenschaftlicher Erkenntnisse in ihrer Funktion näher charakterisiert werden.

#### **1.3.1.1 Claudin 2**

Claudin 2 bildete in Überexpressionsstudien eine parazelluläre Pore (Porengröße: 3 - 4 Å) [12] mit Permeabilität für Kationen und Wasser [13-17]. Experimente an Claudin 2 defizienten Mäusen [18] konnten die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse über die parazellulären Eigenschaften dieses Claudins weiter festigen. So zeigte sich auch *in vivo* eine Reduktion der Kationenpermeabilität in Claudin 2 defizienten Mäusen, welche unter Salzbelastung zu einer deutlichen Steigerung der Natrium- und Chloridexkretion führte. Zudem zeigte sich eine Hyperkalziurie, welche zu der Hypothese führte, dass Claudin 2 ebenfalls in die parazelluläre Kalziumresorption des proximalen Tubulus involviert ist.

#### **1.3.1.2 Claudin 10a**

Claudin 10a ist eine Splicevariante des Claudin 10 mit Variation des ersten Exons [19]. Funktionell zeigte sich bei Überexpression von Claudin 10a im Zellmodell eine Erhöhung der Anionenpermeabilität [20]. Dafür scheint die basische Aminosäure Arginin an Position 32 und 59 in der ersten extrazellulären Schleife dieses Claudins von besonderer Bedeutung zu sein.

#### **1.3.1.3 Claudin 11**

Wissenschaftliche Erkenntnisse für Claudin 11 bestehen im Wesentlichen für das zentrale Nervensystem [21] sowie für den Hoden [22]. Die maßgebliche Beteiligung von Claudin 11 an der Blut-Hoden-Schranke führte zu der Hypothese eines Barrierebildenden Proteins.

#### **1.3.1.4 Claudin 12**

Für Claudin 12 lassen sich aufgrund der eingeschränkten Datenlage bisher keine definitiven renalen Funktionen ableiten. Als eines von wenigen Claudinen weist es keine PDZ-Domäne auf. Im Darm ist Claudin 12 wesentlich an der Kalziumresorption beteiligt und wird dort wie Claudin 2 durch aktiviertes Vitamin D<sub>3</sub> reguliert [23, 24].

### **1.3.1.5 Claudin 17**

Claudin 17 scheint die Permeabilität der parazellulären Barriere für Anionen wesentlich zu beeinflussen. Funktionell zeigte sich für dieses Claudin eine deutliche Ladungsselektivität bei nur geringer Größenselektivität. Die Integration von Claudin 17 in die Tight junction ermöglichte zellexperimentell somit die Verschiebung von kleineren organischen Anionen über den parazellulären Spalt [25].

## **1.4 Die Kalziumhomöostase**

Das divalente Kation Kalzium hat für viele Funktionen des Organismus eine herausragende Bedeutung [2, 26]. So vermittelt es als intrazelluläres Signalmolekül unter anderem die Aggregation von Thrombozyten, die Exozytose von präsynaptischen Vesikeln oder die Interaktion von Aktin- und Myosin-Filamenten. Im Knochen ist es Bestandteil von Hydroxylapatit und gewährleistet damit einen stabilen Aufbau der extrazellulären Matrix. Ein Überschreiten des Löslichkeitsproduktes von Kalzium und Phosphat resultiert in einem Ausfällen von Kalziumsalzen im Gewebe. Diese pathologische Veränderung findet sich bei Erkrankungen wie Arteriosklerose, Nephrokalzinose oder der urämisch kalzifizierenden Arteriopathie. Die Aufrechterhaltung eines konstanten Kalziumspiegels ist daher für den vitalen Organismus von essentieller Bedeutung. Das Zusammenspiel von Knochen, Darm und Niere gewährleistet die Kalziumhomöostase. Während der Knochen dabei im Wesentlichen als schneller Kalziumspeicher mit einer Kalziummenge von bis zu 1 kg fungiert, erfolgt eine langfristige Steuerung des Kalziumspiegels über Sekretion und Resorption im Darm und der Niere. Dabei sind die einzelnen Organe durch die Hormone Calcitonin, Parathormon (PTH), Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) und FGF-23 (*engl.: fibroblast growth factor 23*) strikt reguliert. Dieses komplexe System gewährleistet konstante extrazelluläre Kalziumspiegel von 2,5 mM bei einer täglichen oralen Aufnahme von etwa 1 g Kalzium und einer fraktionellen renalen Kalziumexkretion von etwa 0,5%. Die Beteiligung des proximalen Tubulus soll hinsichtlich der Transportmechanismen und Regulationen in folgenden Abschnitten näher beleuchtet werden.

### **1.4.1 Tubulärer Kalziumtransport**

Die Resorption divalenter Kationen aus dem Primärharn ist entlang des tubulären Systems auf transzellulärem sowie parazellulärem Weg realisiert [2, 9]. Hierbei spielt

der parazelluläre Weg mit etwa 90-prozentiger Resorption aller filtrierten Kalzium Ionen entlang des proximalen Tubulus sowie der TAL die bedeutendere Rolle.

Wesentliche Triebkraft für die parazelluläre Resorption divalenter Kationen im proximalen Tubulus ist das späte lumenpositive transepitheliale Potential. 65% des filtrierten Kalziums und 30% des filtrierten Magnesiums können so bereits im proximalen Tubulus resorbiert werden. Wissenschaftliche Arbeiten über Claudin 2 und Claudin 12 stützen die Hypothese einer kritischen Rolle selbiger Claudine für die proximal tubuläre Kalziumresorption. Im Mausmodell zeigte sich eine Hyperkalziurie nach Ausschaltung des Claudin 2 Gens [18]. Zusätzlich zeigte sich in weiteren Versuchsreihen eine Reduktion der Claudin 2 Expression mit erhöhter fraktioneller Exkretion (FE) von Kalzium bei erhöhter oraler Aufnahme von Natriumchlorid [27]. In Enterozyten konnte unter Stimulation mit aktivem Vitamin D<sub>3</sub> zudem eine Steigerung der Expression von Claudin 2 und Claudin 12 beobachtet werden [23]. Der Nachweis von Claudin 12 mRNA in Nierengewebe [8] und PCT [11] stützt somit die Hypothese einer Vitamin D<sub>3</sub> abhängigen Expression von Claudin 12 im proximalen Tubulus.

Die weitere parazelluläre Resorption divalenter Kationen erfolgt im Verlauf der TAL. Unter Ausnutzung eines lumenpositiven transepithelialen Potentials werden weitere 60% des filtrierten Magnesiums sowie 25% des filtrierten Kalziums parazellulär resorbiert. Die Beteiligung der Claudine 10b, 16 und 19 scheint hierbei von essentieller Bedeutung zu sein [28].

Im distalen Tubulus ist die Kalziumresorption über ein transzelluläres Transportsystem realisiert. Über luminal exprimierte Kationenkanäle (TRPV5) gelangen Kalzium Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten in die Zelle. Unter transienter Bindung an Calbindin erfolgt ein gerichteter Transport der Kalzium Ionen an die basolaterale Membran, wo sie über primär aktive Kalziumpumpen (PMCA1b) oder sekundär aktive Natrium-Kalzium-Antiporter (NCX1) in das renale Interstitium überführt werden. Rein quantitativ stellt dieser Transportvorgang mit 8% jedoch den geringsten Teil der renalen Kalziumresorption dar.

#### **1.4.2 Regulation des renalen Kalziumtransportes**

Wie bereits zu Beginn von 1.4 beschrieben ist es notwendig, die Kalziumkonzentrationen in den unterschiedlichen Kompartimenten eines Organismus konstant zu halten. Die Ausscheidung oder Retention von Kalzium Ionen in der Niere trägt wesentlich zur Aufrechterhaltung dieser konstanten Kalziumspiegel bei. Über



unterschiedliche Hormone (Tabelle 1) sowie über die Kalziumkonzentration selbst kann der Funktionszustand der Niere mit dem Ziel einer Kalziumhomöostase moduliert werden.

Hormon	Knochen	Niere		Darm	
	Mineralisierung	Kalziumresorption	Phosphatresorption	Kalziumresorption	Phosphatresorption
PTH	↓	↑	↓		
Calcitriol	↓	↑	↓	↑	↑
FGF 23			↓		
Calcitonin	↑	↓	↓		

Tabelle 1  
Hormone und ihre Wirkungen auf den Kalziumhaushalt.

Die kontinuierliche Messung der Plasmakalziumkonzentration über den Kalziumsensitiven Rezeptor CaSR (*engl.: calcium sensing receptor*) ist die Grundlage der hormonell regulierten Kalziumhomöostase. Bereits eine geringe Reduktion der ionisierten Kalziumkonzentration führt in der Nebenschilddrüse zur Ausschüttung von Parathormon (PTH). Neben einer Stimulation von Osteoklasten mit akuter Freisetzung von Kalzium und Phosphat aus dem Knochen führt PTH zu einer Steigerung der renalen Exkretion von Natrium und Phosphat. Die gesteigerte Ausscheidung von Phosphat Ionen erfolgt hierbei über Internalisierung und Degradation des proximal tubulären Natrium-Phosphat-Symporters NaPi [29]. Diese gegensätzliche Regulation aus gesteigerter ossärer Kalziumfreisetzung sowie reduzierter renaler Phosphatresorption beugt einer Überschreitung des gemeinsamen Löslichkeitsproduktes vor und verhindert somit effektiv die intravitale Bildung von Kalziumphosphatkristallen. Der diuretische Effekt einer gesteigerten PTH-Sekretion beruht vorwiegend auf einer Hemmung des proximal tubulären Natrium-Protonen-Austauschers (NHE3) [30]. Die verminderte Resorption von Natrium sowie Hydrogencarbonat Ionen resultiert bei eingeschränkten Kompensationsmechanismen distaler Tubulussegmente folglich in einer gesteigerten, osmotisch vermittelten Diurese.

Ein additiver Effekt des PTH zur Steigerung der Plasmakalziumkonzentration ist die Stimulation der proximal tubulären 1 $\alpha$ -Hydroxylase. Über Hydroxylierung von hepatisch gebildetem Calcidiol zum aktiven Vitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol) erfolgt eine längerfristige Steigerung der renalen sowie enteralen Kalziumresorption. Die Steigerung der renalen Kalziumresorption ist dabei ähnlich zum PTH vornehmlich im

distalen Tubulus realisiert. Neben einer vermehrten Integration von TRPV5-Kanälen in die luminale Plasmamembran steigert Calcitriol die Expression zytosolischer Kalzium-Transportproteine (Calbindin) mit folglich gesteigerter Resorptionskapazität. Im Knochen führt Calcitriol zu einer Aktivierung der Osteoklasten mit resultierendem Knochenabbau [31-33]. Dieser Effekt wird jedoch *in vivo* durch die inhibierende Wirkung auf die Ausschüttung von PTH aus den Nebenschilddrüsen aufgehoben.

Da eine überschießende Aktivierung von Vitamin D<sub>3</sub> über eine gesteigerte enterale Kalziumresorption zu multiplen Gewebeverkalkungen führen kann, wird bei adäquater Remineralisierung des Knochens mit dem FGF-23 ein wichtiger Inhibitor dieser Aktivierung gebildet [34]. Die Bindung des osteoblastären FGF-23 an den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 und den Co-Rezeptor Klotho führt über eine intrazelluläre Signalkaskade schließlich zu einer verminderten renalen Hydroxylierung von Vitamin D<sub>3</sub>. Zudem vermittelt der FGF-23 analog zum PTH eine Steigerung der renalen Kalziumresorption bei erhöhter Ausscheidung von Phosphat. Erhöhte Serumkalziumspiegel stimulieren ergänzend die Freisetzung von Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse. Dieses Proteohormon hemmt die Aktivität der Osteoklasten und fördert den osteoblastären Einbau von Kalzium in den Knochen. Im proximalen Tubulus führt Calcitonin zudem zu einer vermehrten Internalisierung von luminal exprimierten Natrium-Phosphat-Symportern mit folgender Steigerung der renalen Phosphatausscheidung.

Neben der Regulation über den Blutweg verfügt die Niere auch über autoregulative Vorgänge zur Aufrechterhaltung konstanter Kalziumspiegel. Dies ist vor allem für die TAL beschrieben. Über Expression des CaSR erfolgt eine kontinuierliche Messung der interstitiellen Kalziumkonzentration. Hohe interstitielle Kalziumspiegel führen über Modulation der Claudin-Komposition in den Tight junctions zu Veränderungen des parazellulären Weges mit einer verminderten Resorption von Kalzium [35, 36]. Regulative Vorgänge zur Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase modifizieren somit transzelluläre sowie parazelluläre Resorptionsvorgänge der Niere.

### **1.5 Mechanismen zur Regulation der Proteinfunktion**

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase resultieren stets in einer Regulation zellulärer Funktionsproteine mit dem Ziel einer Anpassung an die aktuellen Bedingungen. Auf molekularer Basis kann die Menge sowie die Funktion eines Proteins vielfältig reguliert werden. Im

folgenden Abschnitt soll daher kurz auf die prinzipiellen Möglichkeiten zur Regulation der Proteinfunktion eingegangen werden (Abbildung 5). Unter Stimulation von Promotoren auf der DNA (*engl.: desoxyribonucleic acid*) werden je nach Bedarf einer Zelle Gene transkribiert. Bereits auf Ebene der mRNA kann eine Interaktion mit miRNAs (*engl.: micro RNA*) zu einer vermehrten Degradation der transkribierten mRNA führen [37]. Funktionell führt diese Interaktion zu einer quantitativen Reduktion an funktionellem Protein. Nach Translation der mRNA in eine Aminosäuresequenz und Proteinfaltung kann eine weitere posttranslationale Modifikation des Proteins erfolgen [26]. Hierzu zählt unter anderem die Kopplung des Proteins mit organischen oder anorganischen Gruppen im Rahmen einer Glykosylierung, Ubiquitinilierung oder Phosphorylierung. Diese Reaktionen sind in vielen Zellen über rezeptorvermittelte Signalkaskaden gesteuert. Unabhängig von der Genexpression kann so eine weitere Aktivierung, Inaktivierung oder Degradation von Zielproteinen erfolgen. Als weiterer wichtiger Regulationsmechanismus der Proteinfunktion gilt das Membran-Trafficking [38] (*engl.: Handel, im Sinne von Transport zwischen einzelnen Zellkompartimenten*). Dabei können Membranproteine in kleinen intrazellulären Vesikeln nahe der Plasmamembran gespeichert werden, welche nur unter bestimmten Bedingungen mit der Plasmamembran fusionieren.

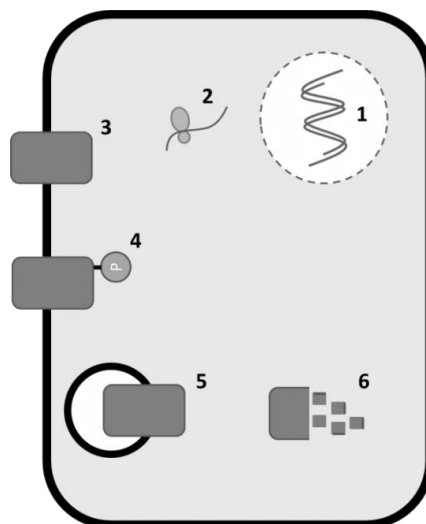


Abbildung 5

Schematische Darstellung von Regulationsmöglichkeiten der Proteinfunktion.

Die Transkription erfolgt unter Stimulation spezifischer Promotoren (1). Die entstehende mRNA kann durch alternatives Splicing modifiziert oder durch Bindung an miRNAs abgebaut werden. Nach der Translation (2) gelangt das Protein an seinen Bestimmungsort (3) und kann dort weiter modifiziert werden (4). Eine Minderung der Proteinfunktion ist ebenfalls über Internalisierung (5) von Membranproteinen möglich. Dabei gelangen Proteine in submembranäre Vesikel und werden nur bei Bedarf in die Membran integriert. Zudem kann die Proteinmenge über den Abbau von Proteinen (6) im Proteasom oder Lysosom reguliert werden.

## 1.6 Bestehende Zelllinien des proximalen Tubulus

Als Modell für den proximalen Tubulus stehen verschiedene kommerzielle immortalisierte oder primäre Zelllinien zur Verfügung. Die immortalisierten Zelllinien stammen aus unterschiedlichen Organismen und wurden häufig für Toxizitätsstudien herangezogen. Verwendung fanden vor allem die Zelllinien LLC-PK1 (ATCC® CL-101™) aus dem Schwein, OK (ATCC® CRL-1840™) aus dem Opossum und NRK-52E (ATCC® CRL-1571™) aus der Ratte. Die parazellulären Eigenschaften dieser Zelllinien waren äußerst heterogen [39]. Neben einer starken Variation des transepithelialen Widerstandes wurde in keiner dieser immortalisierten Zelllinien eine stabile Integration von Claudin 2 in die Plasmamembran beobachtet. Zusätzlich zu immortalisierten Zelllinien wurden primäre Zellkulturen des proximalen Tubulus für einige Versuchsreihen etabliert. Diese Primärzellen wurden zumeist über Filtration, Dichtegradienten-Zentrifugation [40-43], Durchflusszytometrie / FACS (*engl.: fluorescence activated cell sorting*) [44] oder mechanische Isolation [45-47] aus unterschiedlichen Organismen generiert. Die Präparationsmethoden haben dabei stets einen Kompromiss hinsichtlich der Ausgangsmenge an Zellmaterial und der Spezifität der isolierten Zellen dargestellt.

## 1.7 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde der proximale Tubulus zunächst hinsichtlich seiner parazellulären Eigenschaften charakterisiert. Anschließend wurde der Einfluss von Störfaktoren der Kalziumhomöostase auf die parazellulären Eigenschaften des proximalen Tubulus untersucht.

Die Hypothese war das Vorliegen einer Änderung der funktionellen Claudin Expression im Dienste der Kalziumhomöostase. Hierzu wurden Versuche an *nativen proximalen Tubuli* und *kultivierten Primärzellen des proximalen Tubulus* durchgeführt:

*Nativer proximaler Tubulus:*

1. Bestimmung der grundlegenden parazellulären Eigenschaften des nativen proximalen Tubulus im Verlauf seiner Segmente S1 bis S3
2. Bestimmung der Claudin Expression des proximalen Tubulus nach unterschiedlicher diätetischer Kalziumzufuhr

*Kultivierte Primärzellen des proximalen Tubulus:*

1. Bestimmung der parazellulären Eigenschaften sowie der Claudin Expression eines epithelialen Verbandes kultivierter Primärzellen des proximalen Tubulus
2. Bestimmung der parazellulären Eigenschaften eines epithelialen Verbandes kultivierter Primärzellen des proximalen Tubulus unter dem Einfluss einer erhöhten Kalziumkonzentration

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden in der reinsten Form bei den Firmen Sigma Aldrich (St. Louis, US), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D) und Merck und Co, Ink. (Whitehouse station, US) bezogen. Alle weiteren Materialien werden separat mit jeweiligem Hersteller und Produktnamen aufgeführt.

#### 2.1.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten C57BL/6J Mäuse (Charles River, Sulzfeld, D). Aufgrund besserer mechanischer Dissezierbarkeit wurden für die Tubulusperfusion lediglich Mäuse mit einem maximalen Lebensalter von 8 Wochen eingesetzt. Um den Einfluss des oralen Angebots von Kalzium und Phosphat auf die Claudin Expression und den parazellulären Weg zu untersuchen, bekamen die Tiere für eine Woche Spezialfutter mit definierter Zusammensetzung für Kalzium und Phosphat (Tabelle 2).

Diät	Kalzium-Gehalt	Phosphat-Gehalt
Kontrolle	0,9%	0,6%
Niedrig Kalzium	< 0,06%	0,6%
Hoch Kalzium	5,0%	0,6%
Hoch Phosphat	0,9%	2,0%

Tabelle 2  
Zusammensetzung des Spezialfutters (Anteil am Trockengewicht).

### 2.1.3 Lösungen und Reagenzien

#### 2.1.3.1 Präparation von Tubulussegmenten

#98b	Basis-Lösung	
	Substanz	Konzentration mM
	NaCl	140
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,6
	MgSO <sub>4</sub>	1
	Na-Acetat	10
	α-Ketoglutarat	1
	Ca-Gluconat	1,3
	in H <sub>2</sub> O	
	pH Einstellung auf 7,4 mittels NaOH / HCl	

Inkubations-Lösung		
	Substanz	Konzentration mg/100ml
	Deferoxamin	6,6
	DNase I	2,5
	Glycin	37,5
	Trypsin-Inhibitor	4,8
	in #98b	
	Aufreinigung durch Sterilfiltration	

Sortier-Lösung		
	Substanz	Konzentration mg/100ml
	Albumin	25
	in Inkubations-Lösung	
	Aufreinigung durch Sterilfiltration	

#### 2.1.3.2 Fluoreszenz-Immunhistochemie

- PBS (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), Standardpuffer (*engl.: phosphate buffered sialine*)

PBS-T	
Substanz	Konzentration
Triton in PBS	0,3% w/v

10mM Citrat-Puffer	
Substanz	Konzentration mM
Zitronensäure-Monohydrat in H <sub>2</sub> O	10
pH: 6,0	

- Fixiermedium Mowiol/Dabco (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D)
- DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D)

#### 2.1.3.3 *Semiquantitative RT-PCR*

- RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, D)
- QuantiTect Reverse Transkription Kit (Qiagen, Hilden, D)
- QuantiFast SYBR Green Kit (Qiagen, Hilden, D)
- Agarose (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D)
- TBE-Puffer (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D)
- SYBR Safe (Life Technologies, Carlsbad, US)
- 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Waltham, US)
- Gene Ruler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, US)



#### 2.1.3.4 Western Blot

5x Laemmli-Puffer	
Substanz	Konzentration
Tris/HCl	312,5 mM
SDS	10% w/v
Bromphenolblau	0,004% w/v
Glycerol	40% v/v
Dithiothreitol	520 mM
in H <sub>2</sub> O	
30min durchmischen, 10min auf 55°C erwärmen	

TBS-T	
Substanz	Konzentration
Tris/HCl	76,87 mM
NaCl	150 mM
Tween	0,05% v/v
in H <sub>2</sub> O	
pH Einstellung auf 7,6 mit NaOH / HCl	

10x Elektroden-Puffer	
Substanz	Konzentration
Glycin	1,92 M
Tris	250 mM
SDS	1% v/v
in H <sub>2</sub> O	
keine Einstellung des pH	

Tank-Blot-Puffer	
Substanz	Konzentration
Glycin	192 mM
Tris	20 mM
Methanol	20% v/v
in H <sub>2</sub> O	
pH: 8,3	

4x Sammelgel-Puffer	
Substanz	Konzentration
Tris/HCl	0,5 M
SDS	0,4% w/v
in H <sub>2</sub> O	
pH: 6,8	

4x Trenngel-Puffer	
Substanz	Konzentration
Tris/HCl	1,5 M
SDS	0,4% w/v
in H <sub>2</sub> O	
pH: 8,8	

6,5% Sammelgele	
Substanz	Volumen $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	5770
4x Sammelgel-Puffer	2500
40% Acrylamid	1630
10% APS	75
TEMED	30

10% Trenngele	
Substanz	Volumen $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	9790
4x Trenngel-Puffer	5000
40% Acrylamid	5000
10% APS	150
TEMED	60

Ponceau-Rot	
Substanz	Konzentration
Ponceau S	9 mM
Essigsäure in H <sub>2</sub> O	1% v/v
keine Einstellung des pH	

- Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)

#### 2.1.3.5 Tubulusperfusion

#2	Kontroll-Lösung	
	Substanz	Konzentration mM
	NaCl	145
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,6
	Glucose	5
	MgCl <sub>2</sub>	1
	Ca-Gluconat	1,3
	in H <sub>2</sub> O	
	pH Einstellung auf 7,4 mittels NaOH / HCl	

#2a	Minimal-Lösung	
	Substanz	Konzentration mM
	NaCl	145
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,6
	Mannitol	5
	MgCl <sub>2</sub>	1
	Ca-Gluconat	1,3
	in H <sub>2</sub> O	
	pH Einstellung auf 7,4 mittels NaOH / HCl	

#61	Niedrig Natriumchlorid-Lösung	
Substanz		Konzentration
		<i>mM</i>
NaCl		30
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		1,6
Glucose		5
MgCl <sub>2</sub>		1
Ca-Gluconat		1,3
Mannitol		230
in H <sub>2</sub> O		
pH Einstellung auf 7,4 mittels NaOH / HCl		

#170	Hoch Calciumchlorid-Lösung	
Substanz		Konzentration
		<i>mM</i>
KCl		3,6
Glucose		5
CaCl <sub>2</sub>		72,5
HEPES		3
Mannitol		75
in H <sub>2</sub> O		
pH Einstellung auf 7,4 mittels KOH / HCl		

#168	Hoch Magnesiumchlorid-Lösung	
Substanz		Konzentration
		<i>mM</i>
KCl		3,6
Glucose		5
MgCl <sub>2</sub>		72,5
HEPES		3
Ca-Gluconat		1,3
Mannitol		71
in H <sub>2</sub> O		
pH Einstellung auf 7,4 mittels KOH / HCl		

## 2.1.3.6 Zellkultur

#97	UK mpPTEC-Lösung	
Substanz		Konzentration
		<i>mM</i>
NaCl		112
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		1,6
MgCl <sub>2</sub>		1
Na-Acetat		10
Glycin		2
CaCl <sub>2</sub>		1,3
NaHCO <sub>3</sub>		24
Glucose		10
in H <sub>2</sub> O		
pH Einstellung auf 7,4 mittels NaOH / HCl		

#97a	UK glucosefreie mpPTEC-Lösung	
Substanz		Konzentration
		<i>mM</i>
NaCl		112
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		1,6
MgCl <sub>2</sub>		1
Na-Acetat		10
Glycin		2
CaCl <sub>2</sub>		1,3
NaHCO <sub>3</sub>		24
in H <sub>2</sub> O		
pH Einstellung auf 7,4 mittels NaOH / HCl		

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Präparation von Tubulussegmenten

Nach Inhalationsanästhesie der Maus mit 5% Isofluran (Abbott GmbH, Wiesbaden, D) in der Atemluft wurde eine beidseitig erweiterte mediane Laparotomie mit fakultativer Punktion der Blase zur Gewinnung von Spontanurin durchgeführt. Die untere Hohlvene wurde zur Gewinnung einer Blutprobe und Eröffnung des venösen Schenkels anschließend mit einer 1 ml Spritze und 22 G 1 ¼ Zoll Kanüle punktiert. Die abdominale Aorta wurde in stumpfer Technik mit zwei Pinzetten präpariert und suprailiakkal mit einer Gefäßklemme versehen. Die infrarenale Aorta wurde mit Hilfe einer Federschere senkrecht zum Gefäßverlauf eingeschnitten und oberhalb der Inzisionsstelle durch ein Wattestäbchen komprimiert. Eine 1 ml Spritze wurde mit Enzymlösung (Collagenase II 1 mg/ml in Inkubations-Lösung) befüllt und in einer Spritzenheizung auf 37° C erwärmt. Die Spritze wurde über einen Adapter mit einem zuvor präparierten Perfusionskatheter verbunden. Mit diesem Polyethylenschlauch (Durchmesser circa 0,1 mm) wurde die infrarenale Aorta kanüliert und eine retrograde Perfusion der Nieren durchgeführt. Das deutlich sichtbare Abblassen des Nierengewebes diente der optischen Kontrolle des Perfusionserfolges. Nach dem Entfernen des Perfusionskatheters erfolgte umgehend die bilaterale Nephrektomie und finale mediane Thorakotomie. Die Nierenkapsel wurde mit Hilfe von zwei Pinzetten entfernt. Das dekapsulierte Nierengewebe wurde mit einer Skalpell-Klinge in feine, transversale Schnitte (kleiner als 0,5 mm) zerteilt. Die Nierenpole wurden verworfen und das gewonnene Material weiter enzymatisch verdaut. Zu diesem Zweck erfolgte eine 10-minütige Inkubation in einem Thermomixer (Compact, Eppendorf, Hamburg, D) bei 37° C und 850 Schüttelbewegungen pro Minute. Nach Ablauf des Zeitintervalls wurde 1 ml des tubulusreichen Überstandes in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, welches 1 ml eisgekühlte Sortier-Lösung enthielt. Der mechanisch unterstützte enzymatische Verdau des Nierengewebes im Thermomixer wurde nach Zugabe von 1 ml Inkubationslösung für drei weitere fünf minütige Zyklen fortgeführt. Die Überstände wurden dabei stets in neue 1 ml Sortier-Lösung fassende Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gelagert.

#### 2.2.1.1 *Material für die Zellkultur*

Für die Präparation der Zellkultur wurden Transwell Filtereinsätze mit 0,33 cm<sup>2</sup> großer, 10 µm dicker Polyestermembran und einer Porendichte von  $4 \times 10^6$

Poren/cm<sup>2</sup> bei einer Porengröße von 0,4 µm verwendet (Corning Incorporated, Lowell, US). Die Transwell Filtereinsätze wurden mindestens vier Stunden vor Versuchsbeginn in 24-Loch-Platten eingesetzt, mit Zellkulturmedium versehen und in einem Inkubator (B5060 EK CO<sub>2</sub>, Heraeus, Hanau, D) bei 8% CO<sub>2</sub> und 37° C äquilibriert. Analog zu 2.2.1 wurden Tubulussegmente präpariert. Nach kurzem Absinken der heterogenen Tubulussegmente in der gekühlten Sortier-Lösung wurde der segmentarme Überstand verworfen. Das restliche Volumen des 2 ml Reaktionsgefäßes wurde mit einer Pipette resuspendiert. Die Identifikation proximaler Tubulussegmente (Abbildung 6) erfolgte nach histomorphologischen Kriterien unter einem Stereomikroskop (MZ16, Leica, Wetzlar, D). Die Isolation der gewünschten Tubulussegmente erfolgte unter Verwendung zweier geschliffener Pinzetten sowie kontinuierlicher Kühlung des Objektisches auf 4° C.

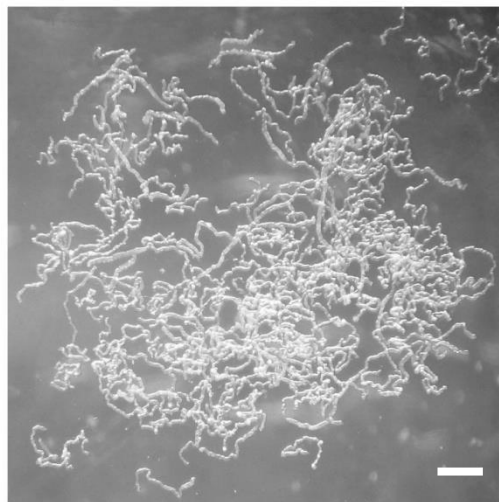


Abbildung 6  
Mikroskopisches Bild isolierter proximaler Tubuli.  
Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Um eine optimale Zellvitalität für die anschließende Kultivierung sicherzustellen, wurde die Zeit vom Tod des Versuchstieres bis einschließlich Tubulusfragment-Isolation auf zwei Stunden limitiert. Die proximalen Tubuli wurden zum weiteren Verdau mittels einer Transferpipette in ein Enzymgemisch überführt. Dieses Enzymgemisch bestand aus Collagenase II (2,2 mg/ml) und Hyaluronidase (2 mg/ml, Serva, Heidelberg, D) in vorgewärmter Inkubations-Lösung. Für den Verdau zu kürzeren proximalen Tubulusfragmenten wurden die Tubuli 30 Minuten lang bei 850

Schüttelbewegungen pro Minute und 37° C in Enzymlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 37° C warmer Sortier-Lösung und fünf minütiger Zentrifugation bei 26,5 x g wurden die Fragmente in 200 µl Zellkulturmedium resuspendiert und gleichmäßig (je 50 µl) in die luminalen Kompartimente von vier Transwell Filtereinsätzen aufgeteilt. Nach Desintegration der einzelnen Tubulusfragmente zu Einzelzellen und Auswachsen auf dem Filtereinsatz wurden die proximalen Tubuluszellen als mpPTEC (*engl.: murine primary proximal tubule epithelial cells*) bezeichnet. Für jeden Versuchsansatz wurde jeweils ein zellfreier Transwell Filtereinsatz als Leerwertprobe für die elektrophysiologischen Messungen mitgeführt.

In einigen Versuchsreihen hatte die Primärzellkultur die Besonderheit, dass neben den eigentlichen Tubulusepithelzellen auf der Filtermembran auch „basolaterale“ Zellen im Kulturansatz anwesend sein sollten. Diese basolaterale Mischkultur wurde aus dem ersten tubulusreichen Überstand des mechanisch-enzymatischen Verdaus der Mausnieren generiert. Der tubulusreiche Überstand wurde hierzu in Sortier-Lösung überführt und nach kurzem Absinken des Zellmaterials dreimalig mit Sortier-Lösung gewaschen. Die gewaschene Tubulussuspension wurde durch ein Gitternetz mit 64 µm Porengröße filtriert und anschließend bei 26,5 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Das Zellmaterial wurde dann in Kulturmedium resuspendiert und in die basolateralen Kompartimente der 24-Loch-Platte ausgesät.

#### **2.2.1.2 Material für die semiquantitative RT-PCR**

Als Ausgangsmaterial für die semiquantitative Analyse der Claudin Expression dienten analog zu 2.2.1.1 isolierte proximale Tubuli von C57BL/6J Mäusen (2.1.2) sowie mpPTEC. Die nativen proximalen Tubulussegmente wurden nach der Isolation mit einer Transferpipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C bis zur RNA-Extraktion gelagert. Die mpPTEC wurden über sieben Tage zu einer konfluierenden, einlagigen Zellschicht auf den 0,33 cm<sup>2</sup> großen Transwell Filtereinsätzen (Corning/Sigma Aldrich, St. Louis, US) kultiviert. Die Filtereinsätze wurden vom Medium befreit und mit je 1 ml PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen vom bewachsenen Filter erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation mit 100 µl Accutase (Sigma Aldrich, St. Louis, US) bei 37° C. Die freien Zellen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 106,2 x g und 37° C separiert. Der zellfreie Überstand wurde verworfen. Nach einmaligem



Waschen der Zellen mit 1 ml PBS wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Extraktion bei -80° C gelagert.

#### **2.2.1.3 Material für den Western Blot**

Als Ausgangsmaterial für die semiquantitative Analyse der Claudin 2 Expression auf Proteinebene wurden analog zu 2.2.1.1 isolierte proximale Tubuli eingesetzt. Diese Tubuli wurden aus Mäusen mit unterschiedlicher oraler Kalzium- und Phosphatzufuhr isoliert (siehe 2.1.2). Sie wurden umgehend mit Laemmli-Puffer versetzt und bei -80° C gelagert. Am Tag der weiteren Verwendung wurden die Proben für fünf Minuten bei 95° C in einem Thermomixer hitzedenaturiert.

#### **2.2.1.4 Material für die Tubulusperfusion**

Für die Tubulusperfusion wurden isolierte proximale Tubuli von C57BL/6J Mäusen verwendet. Die Tubulussegmente wurden in modifizierter Technik analog zu 2.2.1 präpariert. Modifizierend enthielten alle Lösungen 100 µM Deferoxamin, um Eisenbedingte Schäden durch Kontamination mit Mausblut zu vermeiden. Die Präparation der abdominalen Aorta wurde um eine subdiaphragmale Freilegung und Unterbindung durch eine Gefäßklemme erweitert. Die auf 37° C vorgewärmte Enzymlösung enthielt lediglich 0,5 mg/ml Collagenase II (in Inkubations-Lösung). Nach Inzision und Kanülierung der infrarenalen Aorta wurde die untere Hohlvene eröffnet und die Nieren unter leichtem Druck mit der Enzymlösung perfundiert. Die bilaterale Nephrektomie wurde schnellstmöglich durchgeführt und die Nieren zum Transport in Inkubations-Lösung gelagert. Für die weitere Präparation wurden die Nieren dekapsuliert, in 0,5 mm dicke Scheiben geschnitten und in Sortier-Lösung gelagert. Die mechanische Dissektion der einzelnen proximalen Tubulussegmente aus den Nierenschnitten erfolgte mittels zweier geschliffener Pinzetten unter einem Stereomikroskop (MZ16, Leica, Wetzlar, D). Eine Kategorisierung der proximalen Segmentabschnitte erfolgte nach histomorphologischen Kriterien in PCT (*engl.: proximal convoluted tubule*), S2 und S3. Die Präparation der einzelnen Segmentabschnitte erfolgte dabei für PCT und S2 Segmente aus der Nierenrinde und für S3 Segmente aus der Grenzregion zwischen Nierenrinde und Nierenmark.

#### **2.2.2 Zellkultur**

Die Kultivierung der mpPTEC erfolgte in einem B5060 EK-CO2 Inkubator (Heraeus, Hanau, D) bei 37° C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 8% CO<sub>2</sub>. Das Kulturmedium

(GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) setzte sich wie in Tabelle 3 angegeben zusammen.

<b>Basis:</b>	DMEM	
	Glucose	5,55 mM
<b>Zusätze:</b>	Fetales Kälberserum	10%
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	L-Glutamin	2 mM
	ITS X100	1%
	Hydrokortison	50 nM

Tabelle 3  
Zusammensetzung des mpPTEC-Kulturmediums mit Hydrokortison (Rotexmedica, Trittau, D).

Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 48 Stunden unter einer Sterilbank (HERASAFE, Heraeus, Hanau, D). Luminal wurden 150 µl und basolateral 600 µl Kulturmedium appliziert um eine optimale Versorgung mit metabolischen Substraten zu gewährleisten und die Oxygenierung nicht zu beeinträchtigen.

#### **2.2.2.1 Messung des transepithelialen Widerstands unter Kulturbedingungen**

Der transepitheliale Widerstand wurde unter Kulturbedingungen bestimmt (EVOM<sup>2</sup>, WPI, Sarasota, US), da diese Widerstandsmessung Rückschlüsse auf das konfluente Wachstum einer Zellkultur erlaubt. Mittels spezieller Kammern (EndOhm, WPI, Sarasota, US) war es möglich, die mit Medium bedeckten Zellen auf ihren Filtern zu messen. Dazu wurde über Elektroden im luminalen- und basolateralen Kompartiment des Filters ein Wechselstrom appliziert und die resultierende Spannungsauslenkung erfasst. Für den Kontakt von luminaler Elektrode und Medium war hierzu ein minimales luminales Volumen von 150 µl erforderlich. Über Applikation des Ohmschen Gesetzes wurde im Gerät der Widerstand berechnet. Die Werte wurden um den Leerwert korrigiert und nach Multiplikation mit der potenziellen Wachstumsfläche von 0,33 cm<sup>2</sup> dokumentiert. EVOM-Messungen wurden zur Dokumentation des Zellwachstums ab dem vierten Tag nach jedem Wechsel des Kulturmediums durchgeführt. Filter die keinen minimalen Widerstand von 10 Ωcm<sup>2</sup> nach einwöchiger Kultivierung erreichten, wurden von folgenden Experimenten ausgeschlossen.

### 2.2.3 Elektrophysiologie

Die Elektrophysiologie ermöglicht die Untersuchung polarer, einschichtiger Epithelien mit Bestimmung von transepithelialen Potentialen ( $V_{te}$ ), transepithelialen Widerständen ( $R_{te}$ ) und den daraus resultierenden äquivalenten Kurzschlussströmen ( $I_{sc}$ ). Zur Bestimmung der parazellulären Eigenschaften eines Epithels werden, unter Ausschaltung des transepithelialen Transportes, in ihrer Ionenzusammensetzung asymmetrische Lösungen im luminalen und basolateralen Kompartiment eingesetzt. Die resultierenden Gleichgewichtspotentiale werden als Diffusionspotentiale ( $V_{PD}$ ) bezeichnet. Sie entstehen durch die unterschiedliche Permeabilität der Tight junctions für Ionen. Unter Verwendung der  $V_{PD}$  können anschließend die Permeabilitäten für unterschiedliche Ionen berechnet werden. Sie geben entscheidende Hinweise auf die Selektivität der parazellulären Barriere.

#### 2.2.3.1 Tubulusperfusion

##### 2.2.3.1.1 Das Perfusions-System

Die Tubulusperfusion ist die Basis der elektrophysiologischen Analyse nativer Tubuli. Grundlage dieser Untersuchungstechnik ist ein System konzentrischer Pipetten (Abbildung 7) [48].

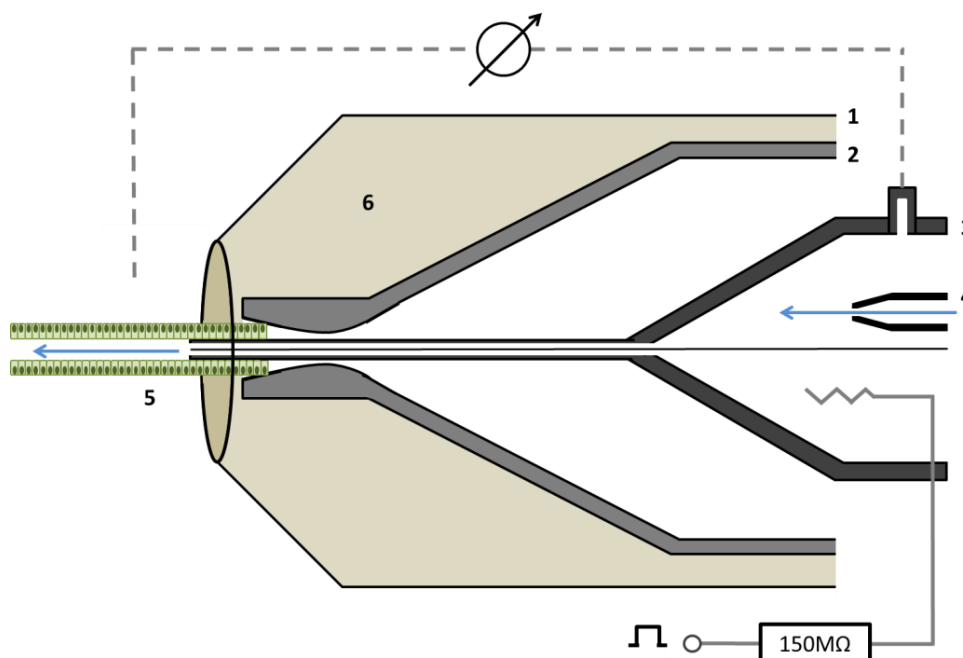


Abbildung 7

Schematische Darstellung des Pipettensystems zur Tubulusperfusion.

1. Sylgard-Pipette 2. Konstriktions-Pipette 3. Doppelläufige Perfusions-Pipette 4. Flüssigkeits-Austausch-Pipette 5. Tubulus 6. Sylgard-Öl

Das System ist in ein elektrisch abgeschirmtes Mikroskop (Axiovert 10, Zeiss, Jena, D) mit digitalem Kamerasystem (RT SE, SPOT, Sterling Heights, US) integriert und motorisiert steuerbar. In einer großen, in Längsrichtung steuerbaren Sylgard-Pipette befindet sich die Konstriktions-Pipette. Über ein angeschlossenes Schlauchsystem ist es möglich an dieser Pipette einen Unter- oder Überdruck zu erzeugen. Das zu perfundierende Tubulussegment wird an der Engstelle (der sogenannten Konstriktion) fixiert und gehalten. Für proximale Tubuli lag der Innendurchmesser dieser Konstriktions-Pipette bei circa 26 - 28  $\mu\text{m}$ . Die weiter innen liegende Perfusions-Pipette ist doppelläufig angelegt und über einen Elektromotor in der Längsachse beweglich. So ist es möglich das Lumen eines mit der Konstriktions-Pipette fixierten Tubulus zu perfundieren. Ein Lauf der Perfusions-Pipette stand über eine Agarbrücke (2,5% in 1 M KCl) und 1 M KCl-Lösung in Verbindung mit einem Differenzverstärker (messende Spannungselektrode). Zusätzlich beherbergte der erste Lauf der Perfusions-Pipette die Flüssigkeits-Austausch-Pipette (*engl.: Fluid-exchange*). Der zweite Lauf der Perfusions-Pipette diente der Aufnahme eines Zu- und Abflusses sowie einer Silberelektrode zur Applikation eines Stromimpulses. Über die Flüssigkeits-Austausch-Pipette wurde in der Regel die luminale Perfusionslösung appliziert. Zur Fixierung des hinteren Schenkels eines isolierten Tubulus wurde auf der gegenüberliegenden Seite des Perfusionssystems eine Halte-Pipette angebracht, an welcher analog zur Konstriktions-Pipette Unter- oder Überdruck angelegt werden konnte. Um konstante Bedingungen für die Messungen und eine optimale Vitalität des Tubulus zu gewährleisten, wurden die Experimente in einem temperierten Bad (37° C) mit kontinuierlichem Lösungswechsel (circa 9 ml/min) durchgeführt. Die konstante Badtemperatur von 37° C wurde neben einer Badheizung über ein beheiztes Doppelschlauch-System realisiert. Für die elektrischen Messungen stand eine zweite Spannungselektrode (Referenzelektrode) über eine Agarbrücke (2,5% in 1 M KCl) und 1 M KCl-Lösung in Kontakt mit der Bad-Lösung. Das erfasste Signal wurde durch einen Differenzverstärker (Werkstatt Physiologisches Institut der CAU Kiel, Kiel, D) amplifiziert und über einen Daten-Schreiber (BD41, Kipp and Zonen, Delft, NL) ausgegeben.

#### 2.2.3.1.2 Versuchsdurchführung

Die entsprechend 2.2.1.4 isolierten proximalen Tubulussegmente wurden mit einer Transferpipette in das beheizte Bad überführt. Das zu perfundierende Ende des

Tubulussegmentes wurde über Unterdruck in der Konstriktions-Pipette fixiert. Unter kontinuierlichem Fluss über die Flüssigkeits-Austausch-Pipette wurde der Tubulus anschließend mit der Perfusions-Pipette perfundiert. Zur Eröffnung des Tubuluslumens wurde mittels Druckgeber (Werkstatt Physiologisches Institut der CAU Kiel, Kiel, D) ein konstanter Druck von ca. 20 - 60 cm H<sub>2</sub>O appliziert. Bereits zu Beginn der Messung wurde mit asymmetrischen, isoosmotischen Lösungen gearbeitet. Die luminale Lösung #2a (Minimal-Lösung) war so zusammengesetzt, dass keine Substrate für sekundär aktive Transportprozesse wie Hydrogencarbonat, Glucose oder Aminosäuren zur Verfügung standen. Die Badlösung #2 (Kontroll-Lösung) hingegen beinhaltete 5 mM Glucose. Hinsichtlich der weiteren ionalen Zusammensetzung waren beide Lösungen identisch.  $V_{te}$  sowie die Änderung des Potentials unter Applikation eines 13 nA Pulses ( $\Delta V_{te}$ ) wurden ab erfolgreicher Perfusion des Tubulus kontinuierlich auf Schreiberpapier aufgezeichnet (Abbildung 8). Für die Bestimmung des  $\Delta V_{te}$  wurde dazu der abgelesene Gesamt- $\Delta V_{te}$  um den Leerwiderstand (Leer- $\Delta V_{te}$ ) des Systems korrigiert.

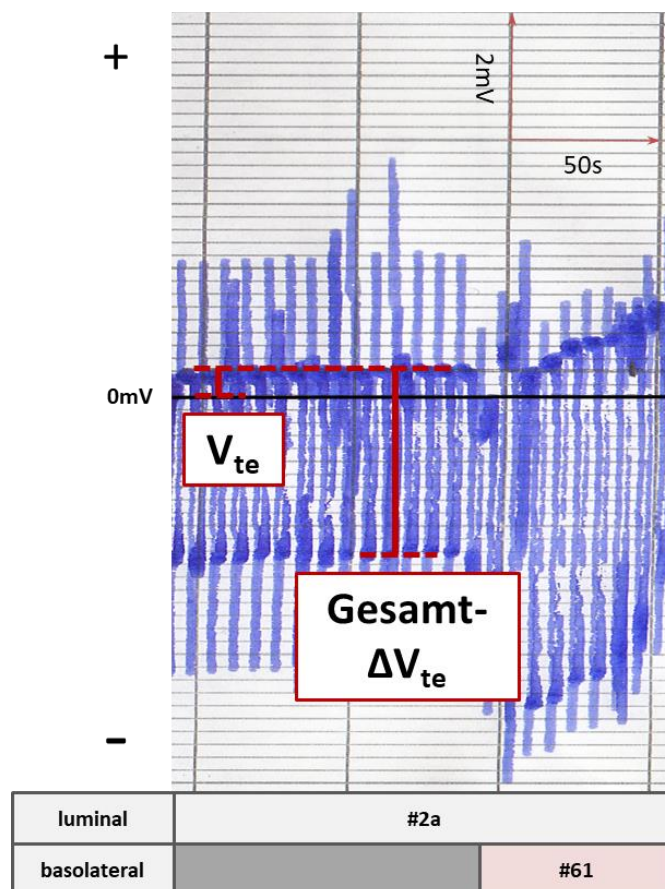


Abbildung 8  
Exemplarische Darstellung der Bestimmung von  $V_{te}$  und  $\Delta V_{te}$  aus den Perfusionsdaten.

$$\Delta V_{te} = \text{Gesamt-}\Delta V_{te} - \text{Leer-}\Delta V_{te}$$

Unter der Annahme, dass sich der Tubulus im Perfusionssystem wie ein elektrisches Kabel verhält, wurde der transepitheliale Widerstand unter Einsatz der Kabel-Gleichung berechnet [49]:

$$R_{te} = 2 \sqrt{\pi \rho \lambda^3 \frac{\Delta V_{te}}{I_0} \tanh \frac{L}{\lambda}}$$

Hierbei sind der spezifische Widerstand des Perfusates mit  $\rho$  und die Länge des Tubulus mit  $L$  angegeben. Die Längenkonstante  $\lambda$  wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\lambda = \frac{\Delta V_{te} \pi r^2}{I_0 \rho}, \text{ für } \frac{L}{\lambda} > 2$$

Zur Bestimmung des Innenradius (in dieser Formel mit  $r$  angegeben) wurden nach jedem Lösungswechsel Bilder des perfundierten Tubulussegmentes angefertigt und mittels Image J ausgemessen. Die mikrovillöse Oberfläche des proximalen Tubulus wurde aufgrund ihrer durchlässigen Struktur nicht als fixe Einengung des Tubulus betrachtet und bei dieser Messung vernachlässigt. Aus den beiden Größen  $V_{te}$  und  $R_{te}$  ließ sich unter Anwendung des Ohmschen-Gesetzes der entsprechende Kurzschlussstrom berechnen, welcher die Summe aller Ionenbewegungen über das Epithel abbildet:

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

Im Verlauf des Experimentes wurde die initiale Badlösung #2 durch die Experimentallösungen #61, #168 und #170 ersetzt. Durch die angelegten Diffusionsgradienten zwischen luminaler und basolateraler Lösung wurden so Diffusionspotentiale ( $V_{PD}$ ) generiert. Sie sind von der Mobilität der einzelnen Ionen sowie der Permeabilität des parazellulären Weges abhängig. Die standardisierte Bestimmung des eingestellten Gleichgewichtspotentials erfolgte 50 Sekunden nach Applikation der Experimentallösungen (Abbildung 9).

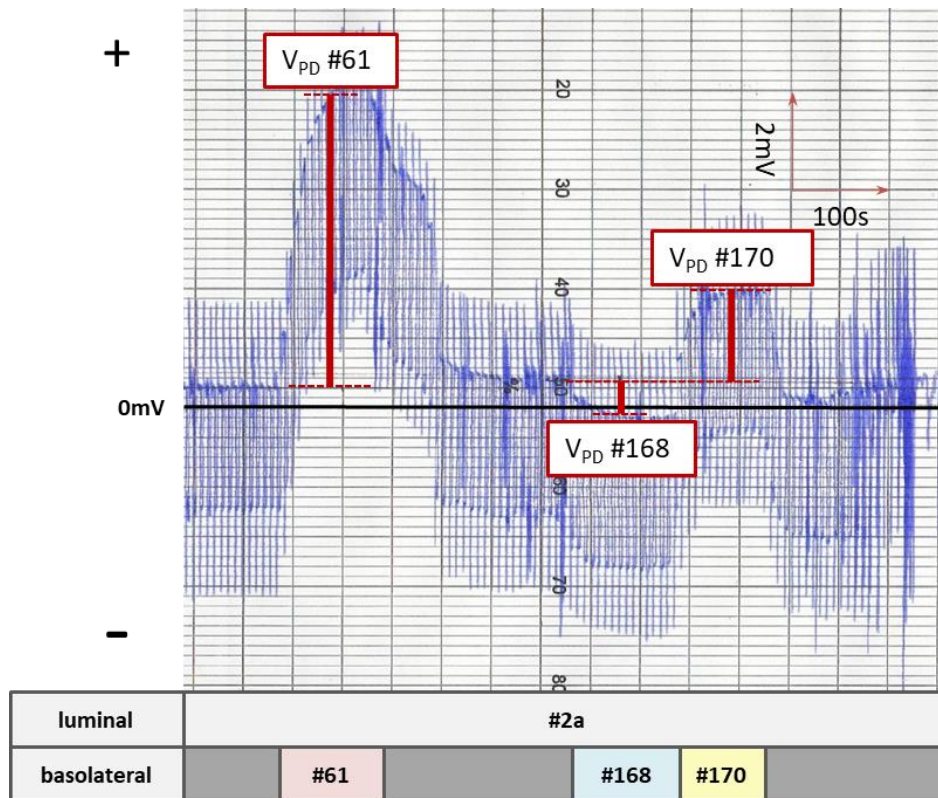


Abbildung 9  
Exemplarische Darstellung der Bestimmung von Diffusionspotentialen im Rahmen der Tubulusperfusion.

### 2.2.3.1.3 Auswertung

Zwischen den Agarbrücken mit 1 M KCl-Lösung und den jeweiligen luminalen sowie basolateralen Experimentallösungen kam es zur Ausbildung von Potentialen an den Flüssigkeitsgrenzflächen (*engl.: liquid junction potential,  $V_{lj}$* ). Besonders unter asymmetrischen Messbedingungen führte dies zu einer systematischen Verschiebung der erhobenen Messwerte ( $V_{PD}$ ) [50]. Alle erhobenen  $V_{PD}$  wurden daher um das entsprechende  $V_{lj}$  korrigiert. Die korrigierten Diffusionspotentiale dienten anschließend zur Kalkulation der relativen Permeabilitäten [49]. Hierzu diente die Goldman-Gleichung für ein Gleichgewichtspotential  $E_m$ :

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{P_{Na} \times [Na^+]_a + P_K \times [K^+]_a + P_{Cl} \times [Cl^-]_i}{P_{Na} \times [Na^+]_i + P_K \times [K^+]_i + P_{Cl} \times [Cl^-]_a} \right)$$

$E_m$ ... Membranpotential  
 $T$ ... Absolute Temperatur in K  
 $P$ ... Permeabilität des jeweiligen Ions  
 $a$ ... Außen

$R$ ... Allgemeine Gaskonstante ( $8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )  
 $F$ ... Faraday-Konstante ( $9,65 \times 10^4 \text{ Asmol}^{-1}$ )  
 $i$ ... Innen

Unter der Annahme, dass sich in den Lösungen #2, #2a und #61 lediglich Natrium und Chlorid Ionen befinden, kann die Goldman-Gleichung umgeformt und die relative Permeabilität für Natrium über Chlorid mit folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{[Cl^-]_{lu} - e^u [Cl^-]_{bl}}{e^u [Na^+]_{lu} + [Na^+]_{bl}}, e^u = \frac{FEm}{RT}$$

Für die Berechnung der relativen Leitfähigkeiten von Kalzium und Magnesium wurden die Diffusionspotentiale der Lösungen #168, #170 gegenüber #2 bestimmt (biionische Diffusionspotentiale). Hierzu wurden die für  $V_j$  korrigierten Diffusionspotentiale in folgende Gleichung [51] eingesetzt:

$$\frac{P_{Ca}}{P_{Na}} = \frac{\left(\frac{P_{Na}}{P_{Cl}}\right)^{-} (e^u + 1)([Cl^-]_{lu} - e^u [Cl^-]_{bl}) - (e^u + 1)(e^u [Na^+]_{lu} - [Na^+]_{bl})}{4(e^{2u} [Ca^{2+}]_{lu} - [Ca^{2+}]_{bl})}$$

Die Berechnung der absoluten Permeabilitäten erfolgte anhand einer Umwandlung der Kimizuka-Koketsu [52] Gleichung:

$$P_{Na} = G_r \frac{RT}{F^2} \frac{1}{\sqrt{\left([Na^+]_i + \frac{P_{Cl}}{P_{Na}} [Cl^-]_a\right) \left([Na^+]_a + \frac{P_{Cl}}{P_{Na}} [Cl^-]_i\right)}}$$

$$P_{Na} = G_r \frac{RT}{F^2} \frac{1}{[NaCl]_{ctrl} \left(1 + \frac{P_{Cl}}{P_{Na}}\right)}$$

### 2.2.3.2 Ussing-Kammer Messungen an mpPTEC

#### 2.2.3.2.1 Die Ussing-Kammer

Die elektrophysiologischen Messungen der mpPTEC wurden in der modifizierten Ussing-Kammer von Willy van Driessche durchgeführt (EP Devices, Bertem, BEL). Dieses System (Abbildung 10) ermöglicht eine getrennte Perfusion von lumenalem und basolateralem Kompartiment durch passgenaue Fixierung bewachsener Transwell Filtereinsätze.



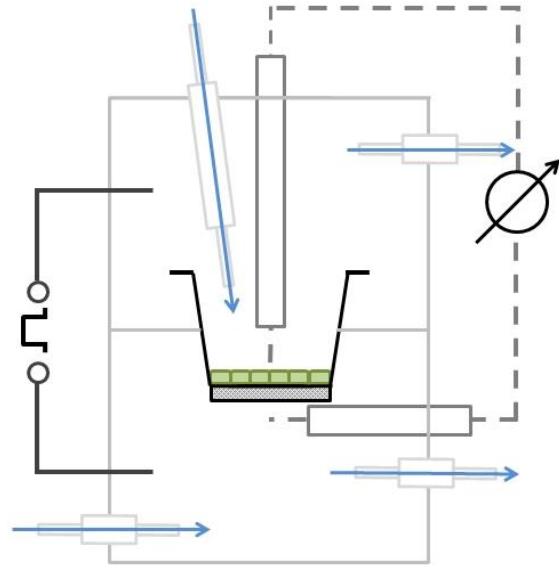
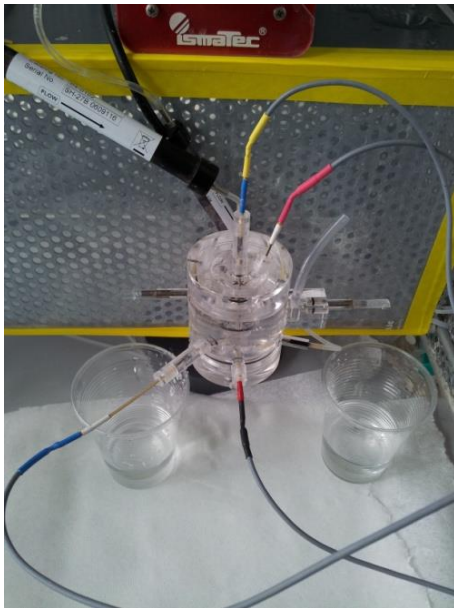


Abbildung 10

Originalbild und schematische Darstellung der modifizierten Ussing-Kammer nach Willy van Driessche.

Der Zufluss zur modifizierten Ussing-Kammer erfolgte über eine Rollerpumpe (ISM849, Ismatec, Wertheim, D) mit 6,8 ml/min. Eine konstante Temperatur von 37° C wurde über ein Heizsystem (2x SH-27B, 1x TC334B, Warner Instrument Corporation, Hamden, US) realisiert.  $V_{te}$  wurde direkt über luminal und basolateral positionierte Spannungselektroden aus chloriertem Silberdraht mit Agarbrücken (2,5% Agar in 1 M KCl) erfasst. Als Referenzelektrode wurde die basolaterale Spannungselektrode festgelegt. Der Abstand der Spannungselektroden von der zu messenden einlagigen Zellschicht wurde dabei möglichst klein gehalten. Über zwei weitere chlorierte Silberelektroden (Stromelektroden) wurden im Intervall von sieben Sekunden für zwei Sekunden lumenegative Strompulse ( $I_{inject}$ ) appliziert und die resultierende Spannungsauslenkung ( $\Delta V_{te}$ ) erfasst. Alle Elektroden wurden mit einem Pulsgenerator/Differenzverstärker (UPG3, AD Elektronik, Buchenbach, D) angesteuert. Die graphische Ausgabe der Daten erfolgte über einen Datenschreiber (BD11E, Kipp und Zonen, Delft, NL) mit einer Verstärkung von 100 mV/mV.

#### 2.2.3.2.2 Versuchsdurchführung

Die Ussing-Kammer Versuche wurden an sieben Tage kultivierten mpPTEC durchgeführt. Die Evaluation des elektrogenen Glucose-Transportes erfolgte mit den Lösungen #97 und #97a. Das Ussing-Kammer System wurde mit einem

Testwiderstand überprüft und die Lösungen mit 5% Carbogen begast. Bei stabilen Elektrodenverhältnissen mit einer Nulllinienverschiebung kleiner als 0,5 mV in fünf Minuten wurde das Experiment begonnen. Nach initialer Anpassungsphase unter Lösung #97a wurde über 3  $\mu$ A Pulse ( $I_{\text{inject}}$ ) die Gesamt- $\Delta V_{\text{te}}$  bestimmt. Anschließend wurde ein luminaler Wechsel auf die Glucose haltige Lösung #97 durchgeführt. Die transepithelialen Spannungen wurden kurz vor dem Wechsel ( $T_1$ ) sowie 100 Sekunden nach Überwinden des Totraumvolumens ( $T_2$ ) erfasst (Abbildung 11).

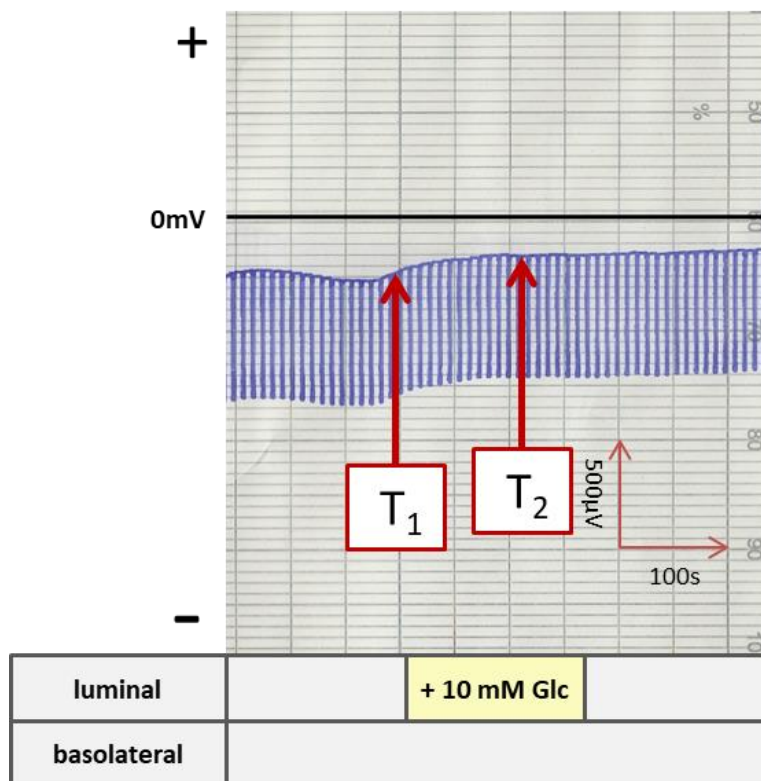


Abbildung 11

Exemplarische Darstellung eines Ussing-Kammer-Versuches zur Messung eines elektrogenen transepithelialen Glucose-Transportes.

Die Messzeitpunkte vor sowie 100 s nach luminalen Lösungswechsel sind rot gekennzeichnet.

Für die Messung von Diffusionspotentialen wurden ionale Konzentrationsgradienten zwischen luminalem und basolateralem Kompartiment generiert. Hierzu erfolgte eine Verwendung der Experimentallösungen #2, #61, #168 sowie #170. Mittels Mannitol wurden selbige Experimentallösungen auf die vorbestehenden Kulturbedingungen (320 mOsmol/kg) angepasst. Nach einem isolierten luminalen Wechsel der Lösungen wurde die Spannungsveränderung ( $V_{\text{PD}}$ ) 50 Sekunden nach Überwinden des Totraumvolumens dokumentiert (Abbildung 12).

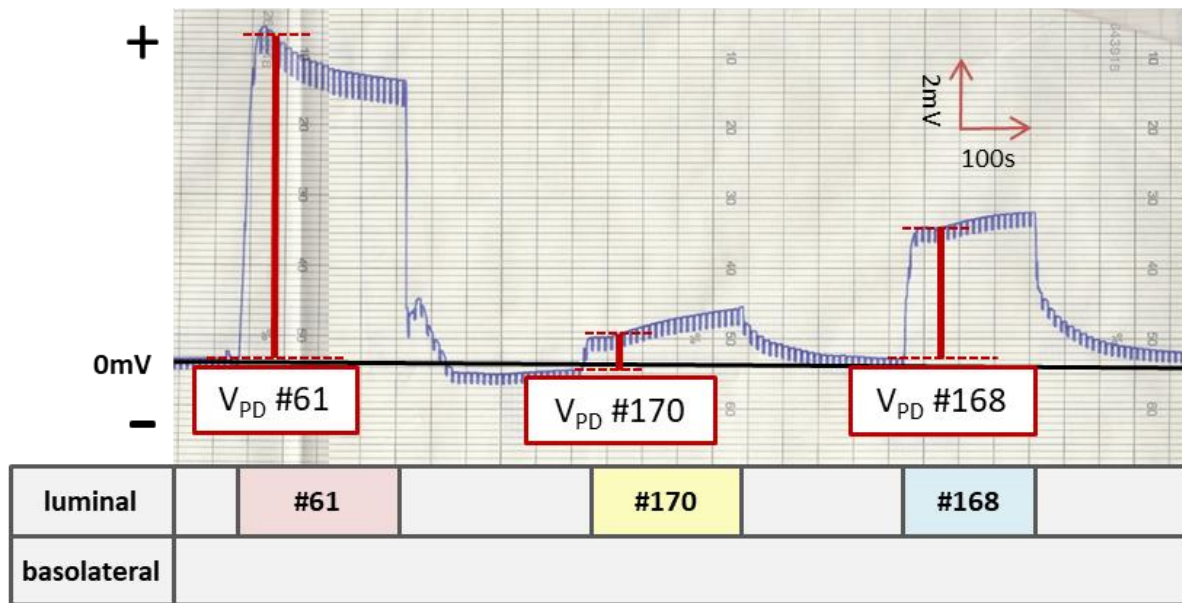


Abbildung 12

Exemplarische Darstellung eines Ussing-Kammer Versuches zur Bestimmung von Diffusionspotentialen.

Die Messzeitpunkte (50 s nach Überwinden des Totraumvolumens) sind mit roten Linien sowie den applizierten luminalen Lösungen gekennzeichnet. Im basolateralen Kompartiment erfolgte lediglich die Applikation von Kontroll-Lösung (#2).

#### 2.2.3.2.3 Auswertung

Die erhobenen Gesamt- $\Delta V_{te}$  Werte wurden um den Leerwert des Messsystems (Leer- $\Delta V_{te}$ ) korrigiert. Das so erhobene  $\Delta V_{te}$  wurde unter Anwendung des Ohmschen Gesetzes zur Kalkulation des transepithelialen Widerstandes verwendet (siehe Formel) und mit der Filterfläche A von 0,33 cm<sup>2</sup> multipliziert.

$$R_{te} = \frac{\Delta V_{te}}{I_{inject}} \times A$$

Der Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) sowie die absoluten und relativen Permeabilitäten wurden unter Berücksichtigung eines luminalen Lösungswechsels analog zur Tubulusperfusion (siehe 2.2.3.1.3) berechnet.

### 2.2.4 Analyse der Claudin Expression mittels semiquantitativer RT-PCR

#### 2.2.4.1 Prinzip

Zur semiquantitativen Expressionsanalyse von Genen auf RNA-Ebene wird die Technik der RT-PCR (*engl.: Real time polymerase chain reaction*) genutzt. Nach Extraktion der mRNA (*engl.: messenger ribonucleic acid*) aus dem Zellmaterial

erfolgten die reverse Transkription in stabilere cDNA (*engl.: complementary desoxyribonucleic acid*) und anschließende Amplifikation gewünschter Nukleotidsequenzen. Über Fluoreszenzsonden oder DNA-Doppelstrang bindende fluoreszierende Farbstoffe ist es möglich, den exponentiellen Anstieg der replizierten cDNA-Sequenz in Echtzeit zu verfolgen und somit Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA zu erhalten [53, 54]. Für die semiquantitative Analyse werden Fluoreszenzsignale der Zielsequenzen mit denen stabil exprimierter Gene („*Housekeeping genes*“) [55] verglichen. Diese Normalisierung erlaubt die Angabe relativer Expressionsraten ohne genaue Kenntnis der initial eingesetzten Gesamt cDNA-Menge.

#### **2.2.4.2 RNA-Isolation**

Die Isolierung der mRNA erfolgte unter Einsatz des RNeasy Micro Kits (Qiagen, Hilden, D) nach Angaben des Herstellers für „Microdissected Cryosections“. Nach dem Auftauen des Probenmaterials wurden die Zellen durch den mitgelieferten RLT-Puffer lysiert. Dieser RLT-Puffer erfordert die Zugabe von 1% v/v Mercaptoethanol. Durch Schütteln des lysierten Gemisches für 30 Sekunden bei 2500 rpm wurde das Zelllysate homogenisiert. Die gewonnene RNA wurde nach Zugabe von 70-prozentigem Ethanol an das Säulenmaterial (RNeasy MinElute Spin Column) gebunden und nach mehreren Waschschritten mit 14 µl RNase freiem Wasser eluiert.

#### **2.2.4.3 Reverse Transkription**

Die reverse Transkription diente dem Umschreiben extrahierter mRNA in komplementäre DNA (cDNA). Dies war notwendig, da der Vorgang der Polymerase Kettenreaktion (PCR) eine DNA-Matrize (*engl.: Template*) benötigt [56]. Die eluierte RNA wurde unmittelbar nach der Isolation gekühlt und mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, D) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Aufgrund der geringen Mengen an RNA und semiquantitativem Ansatz des Experiments wurde auf eine photometrische Mengenanalyse der extrahierten Nukleinsäuren verzichtet und stattdessen das gesamte Volumen (circa 10 µl) für die reverse Transkription eingesetzt. Zum Ausschluss einer Amplifikation genomischer DNA während des Vorgangs der RT-PCR wurden zudem Negativkontrollen (NRTC) generiert, bei denen das Enzym Reverse Transkriptase durch RNase freies Wasser ersetzt wurde. Bei den

eingesetzten Primern handelte es sich um variable Nukleotidsequenzen sowie Desoxythymidin-Primer, welche spezifisch am Poly-A-Schwanz der mRNA binden. Nach erfolgter Primerbindung und Elongation wurde die Probe zur Denaturierung der für die Transkription benötigten Enzyme für drei Minuten auf 95° C erhitzt und dann bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.2.4.4 Semiquantitative Real-Time-PCR

Die semiquantitative RT-PCR wurde mit dem QuantiFast SYBR Green Kit (Qiagen, Hilden, D) durchgeführt. Durch Interaktion des Fluorophors SYBR Green mit doppelsträngigen Nukleinsäuren wurde ein Fluoreszenzsignal mit Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 521 nm generiert. Das ebenfalls im Kit enthaltene Fluorophor ROX emittierte bei 610 nm und diente der Kalibration von Konzentrationsunterschieden des Versuchsansatzes. Für die Normalisierung der Ergebnisse wurden die Gene  $\beta$ -Actin sowie Elongations-Initiations-Faktor 3F (Eif3f) herangezogen. Besonders Eif3f zeigte in Vorstudien eine stabile Expression unabhängig vom untersuchten Gewebe [55]. Die verwendeten Primer (Tabelle 4) wurden in einer Endkonzentration von 625 nM eingesetzt.

Gen	Name	Länge bp	Tm °C	GC-Gehalt %	Amplicon bp	Sequenz
<b><math>\beta</math>-Actin</b>	betAct sense	25	61,0	48,0	98	gacaggatgcagaaggagattactg
	betAct antisense	23	61,9	52,2		ccaccgatccacacagagtactt
<b>Eif3f</b>	mur_Eif3f_left	19	56,7	52,6	81	attcacctcacggtggaca
	mur_Eif3f_right	21	57,9	47,6		agggacaccattaaagtgtct
<b>Claudin 2</b>	mur_CLDN2_#1_le <sup>§</sup>	20	59,0	55,0	75	gtagccggagtcacaccttg
	mur_CLDN2_#1_ri <sup>§</sup>	20	59,0	55,0		ggcctggtagccatcatagt
<b>Claudin 10a</b>	mur_CLDN10a_#2_le	20	59,0	50,0	102	cggccacatttcactatct
	mur_CLDN10a_#2_ri	20	59,0	35,0		gcaaaaatggaaccgaaaaa
<b>Claudin 11</b>	mur_CLDN11_#2_le	20	59,0	55,0	111	ggacatcctcatccttcag
	mur_CLDN11_#2_ri	20	60,0	50,0		atgcaggggagaactgtcaa
<b>Claudin 12</b>	mur_CLDN12_#1_le	22	60,0	41,0	113	ttggagaaacgctgattacctt
	mur_CLDN12_#1_ri	21	59,0	52,0		gcaataccacacaggaaggac
<b>Claudin 17</b>	mur_CLDN17_#2_le <sup>§</sup>	24	59,3	41,7	74	caaaggaatgttactgtgcctaga
	mur_CLDN17_#2_ri <sup>§</sup>	20	59,4	55,0		ccagggactgatgttgaag

Tabelle 4

Übersicht der verwendeten Primer in der RT-PCR.

Primerpaare mit Kennzeichnung <sup>§</sup> überspannen keine Exons. Zum Ausschluss einer Amplifikation von genomischer DNA wurden in diesen Versuchsansätzen additive Negativkontrollen (NRTC) generiert und ausgewertet.

#### 2.2.4.4.1 Versuchsdurchführung

Der Probenansatz wurde in ABI MicroAmp 96-Loch-Platten (Life Technologies, Carlsbad, US) pipettiert, betrug 20 µl pro Loch und wurde in dreifacher Ausführung angelegt. Zum Ausschluss einer Kontamination mit Fremdnukleinsäuren wurden für alle Primer cDNA freie Kontrollen (NTC) durchgeführt. In diesen Kontrollen wurde das Volumen an cDNA durch RNase freies Wasser ersetzt. Zum Ausschluss einer Amplifikation genomischer DNA bei nicht Exon überspannenden Primerpaaren wurden NRTC-Kontrollen durchgeführt. Die Reaktion der semiquantitativen RT-PCR erfolgte in einem ABI 7500 Fast Real-Time-Cycler (Life Technologies, Carlsbad, US). Das Temperaturprotokoll (Tabelle 5) richtete sich nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden, D) und wurde lediglich um den Schritt der Schmelzpunkt-Analyse erweitert.

Temperatur	Zeit	Vorgang
95°C	10min	Hitzeaktivierung der Polymerase
95°C	15sec	40 Zyklen
60°C	30sec	
95°C	15sec	Analyse der Schmelztemperatur

Tabelle 5  
Temperaturprotokoll der RT-PCR.

Eine Anpassung der Annealing-Temperatur war auch bei deutlich niedrigeren Schmelztemperaturen der verwendeten Primer nach Angaben des Herstellers nicht notwendig. Zur weiteren Verifizierung der Amplifikationsprodukte wurden die Probenansätze mit 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Waltham, US) versetzt, in einem 2,5-prozentigen Agarosegel (in TBE-Puffer, Carl Roth GMBH + Co.KG, Karlsruhe, D) bei 120 V für 47 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt, mit einem UV-Farbstoff (SYBR Safe DNA Gel Stain, Life Technonogies, Carlsbad, US) angefärbt und mit Hilfe eines UV-Tisches (TCP 20M, Vilber, Eberhardzell, D) analysiert (Abbildung 13).

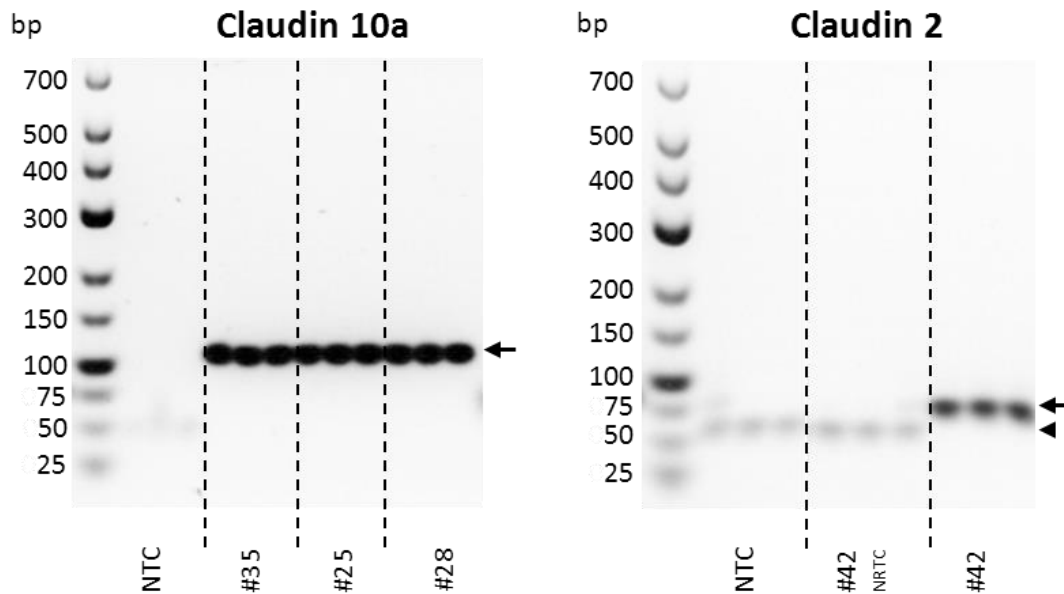


Abbildung 13

Darstellung eines digitalisierten Agarosegels zur Analyse der amplifizierten Produkte im Rahmen der RT-PCR.

Die erwarteten Produktgrößen betragen 102 bp für Claudin 10a sowie 75 bp für Claudin 2 (Pfeile). In der Matrize-freie-Kontrolle (NTC) für Claudin 10a zeigt sich erwartungsgemäß kein Amplifikat. In den Negativkontrollen für Claudin 2 (siehe NTC sowie #42 NRTC) zeigen sich jedoch Banden mit geringer Größe (Pfeilspitze). Diese Banden entsprechen einer Zusammenlagerung von Primern (Primerdimere). Größenstandard: GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, US)

#### 2.2.4.4.2 Auswertung

Die Auswertung der semiquantitativen RT-PCR erfolgte mit der ABI 7500 Software (Life Technologies, Carlsbad, US). Hierfür wurde der Anstieg des Fluoreszenzsignals mit dem Real-Time-Cycler quantifiziert und mit dem Fluoreszenzsignal des internen Kalibrators ROX normalisiert ( $\Delta R_n$ ). Die Amplifikation einer Nukleinsäuresequenz mittels PCR folgt dabei der Formel:

$$X_n = X_0 \times (1 + E)^n$$

Bei idealer Effektivität (E) von 100% verdoppelt sich mit jedem Zyklus (n) die Menge an Ausgangsmaterial ( $X_0$ ). Die Ausgabe der Daten erfolgte als Graph des kalibrierten Fluoreszenzsignals entsprechend der abgelaufenen PCR-Zyklen. Durch den Schnittpunkt dieses Graphen mit einer parallel zur x-Achse verlaufenden Geraden (Threshold) im linearen Anstieg des Fluoreszenzsignals wurden die individuellen  $C_q$ -Werte (engl.: *Cycle of quantification*) für jedes Gen bestimmt (Abbildung 14).

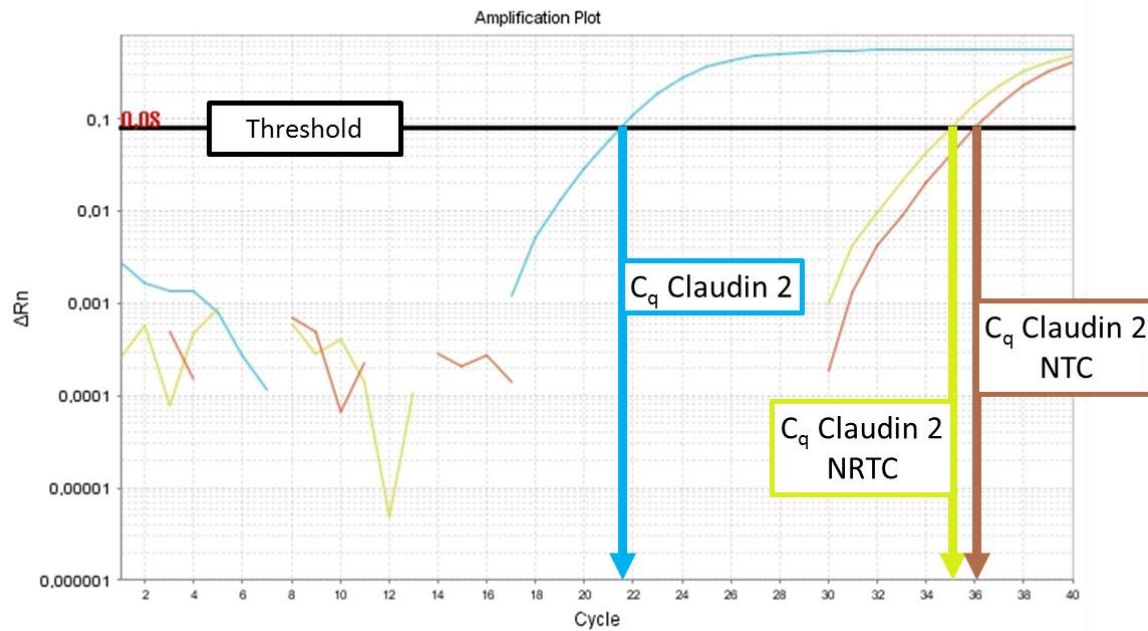


Abbildung 14

Exemplarische Darstellung der Bestimmung des Cycle of quantification ( $C_q$ ) im Rahmen der RT-PCR. Die farbigen Graphen zeigen den Anstieg des kalibrierten Fluoreszenzsignals ( $\Delta R_n$ ) über die Zyklen der PCR. Eine durch den Nutzer bestimmte horizontale Gerade (Threshold) schneidet diese Graphen in der linearen Phase des exponentiellen Fluoreszenzanstieges. Der Threshold liegt dabei deutlich über dem Emissionsniveau zu Beginn der PCR. Der Schnittpunkt des Threshold mit dem jeweiligen Graphen definiert über den zugehörigen x-Wert den  $C_q$ . In diesem Graphen zeigt sich ein sehr hoher  $C_q$ -Wert für die beiden Negativkontrollen (NTC, NRTC). Der  $C_q$ -Wert der analysierten Probe (Claudin 2) ist somit nicht durch ein Fluoreszenzsignal einer Kontamination oder Bildung von Primerdimeren zu erklären.

Der Schnittpunkt  $C_q$  wird umso früher erreicht, je mehr Ziel-Gen-cDNA im initialen Versuchsansatz vorhanden war. Dies resultiert in der adaptierten Formel:

$$X_{C_q} = X_0 \times (1 + E)^{C_q}$$

In der semiquantitativen Analyse werden die  $C_q$ -Werte von Zielgenen mit denen von stabil exprimierten Haushalts-Genen verglichen. Hierzu wurden die Replikate einer Probe initial zu Mittelwerten zusammengefasst und die  $\Delta C_q$ -Werte von Ziel- und Haushalts-Gen berechnet:

$$\Delta C_q = C_q [\text{Ziel-Gen}] - C_q [\text{Haushalts-Gen}]$$

Unter Annahme einer 100-prozentigen Effizienz der PCR kann nun aus den  $\Delta C_q$ -Werten das Verhältnis der Expression eines Ziel-Gens (Y) - zum jeweiligen Haushalts-Gen (X) berechnet werden:



$$\frac{X_{Cq}}{Y_{Cq}} = \frac{X_0 \times (1 + E)^{Cq}}{Y_0 \times (1 + E)^{Cq}}$$

$$\frac{Y_0}{X_0} = k \times 2^{-\Delta Cq} \quad , k = \frac{Y_{Cq}}{X_{Cq}} = \textit{konstant}$$

$$\frac{Y_0}{X_0} = 2^{-\Delta Cq}$$

Für die Angabe der n-fachen Expression wurden die  $2^{-\Delta Cq}$ -Werte einer Diätgruppe arithmetisch gemittelt und in Relation zur Kontrollgruppe betrachtet:

$$\frac{\left[ \frac{Y_0}{X_0} \right]_{\text{Diätgruppe}}}{\left[ \frac{Y_0}{X_0} \right]_{\text{Kontrollgruppe}}} = n$$

#### 2.2.4.4.3 Effizienzbestimmungen

Im Idealfall einer PCR findet eine Verdopplung des primer-umspannten DNA-Materials mit jedem Zyklus (siehe Formel 2.2.4.4.2) statt. Die Effizienz in diesem Fall beträgt 100%. In der Realität wird dieser Idealfall jedoch nur selten erreicht. Ein Mangel an Substraten, sowie Hemmstoffe beeinflussen die Effizienz einer PCR in unterschiedlichem Maße. Wird zum semiquantitativen Vergleich einer Genexpression die Formel  $2^{-\Delta Cq}$  verwendet, müssen die Effizienzen beider PCR-Reaktionen vergleichbar und nahe 100% sein. Eine Vergleichbarkeit der Effizienzen wurde in dieser Arbeit bei einer maximalen Differenz von 10% angenommen. Für die Effizienzbestimmungen wurde Gesamtnierengewebe, sowie Hodengewebe aus C57BL/6J-Mäusen entnommen. Die RNA-Extraktion erfolgte analog zu den Tubulussegmenten nach Angaben des Herstellers mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, D) (siehe 2.2.4.2). Der Gehalt an extrahierter RNA wurde dann mittels Spektrophotometrie ermittelt. Die Generierung von cDNA erfolgte mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, D) analog zu 2.2.4.3. Hierfür wurden für das Hodengewebe 1 µg und für das Gesamtnierengewebe 417 µg RNA eingesetzt. Zur Analyse der Effizienz der PCR-Reaktion bei den gegebenen Bedingungen wurde eine Verdünnungsreihe der extrahierten cDNA über fünf Dekaden angefertigt. Diese Proben wurden dann mit den jeweils verwendeten Primerpaaren in einem ABI 7500 Fast Real-Time-Cycler analysiert und mit der ABI

7500 Software (Life Technologies, Carlsbad, US) ausgewertet. Die erhobenen  $C_q$ -Werte wurden den entsprechenden Verdünnungen zugeordnet. Diese Werte waren die Grundlage eines Graphen mit logarithmisch angelegter x-Achse (Abbildung 15).

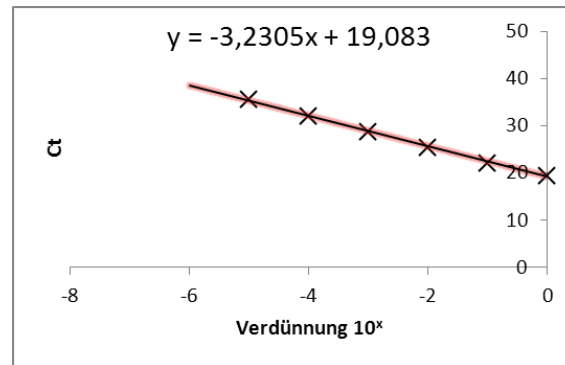


Abbildung 15  
Exemplarische Darstellung der Effektivitätsbestimmung einer Real-Time-PCR.

Über die Steigung  $m$  einer Regressionsgeraden durch die erhobenen  $C_q$ -Werte konnte die Effizienz der PCR-Reaktion unter Anwendung folgender Formel bestimmt werden:

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

## 2.2.5 Analyse der Claudin Expression auf Proteinebene

### 2.2.5.1 Immunfluoreszenz

#### 2.2.5.1.1 Prinzip

Die Immunfluoreszenz dient dem Nachweis von Proteinstrukturen mittels Fluorophor-gekoppelter Antikörper. Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet ein Primärantikörper spezifisch an ein Epitop (antigene Struktur). Der speziesspezifische Fc-Teil des Primärantikörpers wird im Anschluss von einem fluoreszierenden Sekundärantikörper gebunden. Wird der Fluorophor des Sekundärantikörpers nun mit einer definierten Wellenlänge angeregt, kommt es zur Emission eines energieärmeren Lichts größerer Wellenlänge. Liegt dieses emittierte Licht im sichtbaren Spektrum des menschlichen Auges, kann eine Beurteilung von Lokalisation und Intensität unter einem Mikroskop erfolgen.

#### 2.2.5.1.2 Nierenschnitte von Diät-Mäusen

Für die Immunfluoreszenz wurden perfusionsfixierte Nieren verwendet. Unter tiefer Isoflurannarkose erfolgte zunächst eine Eröffnung des murinen Thorax mit anschließender Kanülierung des linken Ventrikels. Unter Applikation von 5 ml 1% Procain in PBS sollte zunächst eine Blutleere des Gefäßsystems erreicht werden. Anschließend wurden 15 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS mit Procain intravasal appliziert. Die Nieren wurden entnommen, dekapsuliert und transversal in circa 0,8 mm breite Streifen zerteilt. Die Nierenpole wurden verworfen. Zur weiteren Fixierung wurde das entnommene Gewebe für zwei Stunden in der PFA-Lösung inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation in 20-prozentiger Saccharose-Lösung (in PBS) über Nacht wurden die Nierenstücke in speziellem Einbettmedium (Jung, Leica Biosystems, Wetzlar, D) schockgefroren und bis zum Schnitt bei -80° C verwahrt. Das Gewebe wurde bei -20° C mit Hilfe eines Kryostaten (CM3050, Leica Biosystems, Wetzlar, D) in 3 µm dünne Scheiben geschnitten und auf einen beschichteten Objektträger (Polysine Slides, Thermo Scientific, Waltham, US) aufgebracht. Potentielle Antigene wurden durch fünf minütiges Kochen in einer Mikrowelle (MM41580, Medion AG, Essen, D) in 10 mM Zitronensäure-Puffer demaskiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T wurden die Objektträger mit den jeweiligen Primärantikörper-Verdünnungen (Tabelle 6) in PBS-T und 1% BSA (*engl.: bovine serum albumin*) versetzt und bei 4° C über Nacht in einer feuchten

Kammer inkubiert. Am Folgetag wurden die Objektträger erneut in eine Küvette überführt und dreimalig in PBS-T gewaschen. Durch diesen Waschschrift wurden überschüssige Antikörper entfernt. Anschließend wurden die Objektträger in einer abgedunkelten, feuchten Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Sekundärantikörpern (Tabelle 6) inkubiert.

Antikörper	Antigen	Verdünnung	Wirtstier	Markierung	Firma
Primär	Maus Claudin 2	1:300	Kaninchen		Life Technologies
Sekundär	Kaninchen IgG	1:400	Esel	Alexa 488	Life Technologies

Tabelle 6

Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper.

Zur Reduktion unspezifisch gebundener Antikörper wurden die Präparate erneut dreimalig mit PBS-T gewaschen und in 1% DAPI in Mowiol/Dabco eingedeckt. Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Axiovert 200M Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, D) mit LSM 510 Modul (Carl Zeiss, Jena, D). Zur Digitalisierung und optischen Ausgabe der konfokalen Daten wurde die LSM Image Browser Software (Carl Zeiss, Jena, D) in der Version 4.2.0.121 verwendet.

#### 2.2.5.1.3 Zellkultur

Nach elektrophysiologischer Evaluation in der Ussing-Kammer wurden die einwöchig kultivierten mpPTEC fixiert. Hierzu wurden die Filtereinsätze für 24 Stunden bei 4° C in PBS-T mit 0,4% PFA inkubiert. Die PFA-Lösung wurde mit größter Sorgfalt abpipettiert und die Filter dreimalig mit PBS-T gewaschen. Nach dem Waschen wurde das luminale Volumen durch 50 µl PBS-T + BSA mit der jeweiligen Primärantikörper-Verdünnung (Tabelle 7) substituiert und für 24 Stunden bei 4° C inkubiert. Am Folgetag wurden die Filtereinsätze erneut dreimalig gewaschen und mit dem Sekundärantikörper sowie Phalloidin (Tabelle 7) in PBS-T inkubiert. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in abgedunkelter Umgebung.

Antikörper	Antigen	Verdünnung	Wirtstier	Markierung	Firma
Primär	Maus Claudin 2	1:300	Kaninchen		Life Technologies
	Maus Claudin 10	1:300	Kaninchen		Life Technologies
Sekundär	Kaninchen IgG	1:400	Ziege	Alexa 633	Life Technologies
Phalloidin	Aktin	1:1000		Alexa 488	Life Technologies

Tabelle 7

Übersicht über die verwendeten Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe für die Immunfluoreszenz-Färbung der mpPTEC.

Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Filter mit einem Skalpell aus der Fassung gelöst und auf einen Objektträger aufgebracht. Die Filter wurden in Mowiol/Dabco eingedeckt und zum Aushärten 24 Stunden abgedunkelt gelagert. Für die Konfluenz-Analyse wurde das Fluoreszenz-Signal der Phalloidin-Färbung mit der Kachel-Funktion eines AX 10 Mikroskops (Carl Zeiss, Jena, D) vollständig digitalisiert und zu einem späteren Zeitpunkt mit der ZEN 2012 Software (Carl Zeiss, Jena, D) ausgewertet. Filter mit einer Konfluenz kleiner 90% wurden von anschließenden Analysen ausgeschlossen. Die Analyse der Lokalisation und Intensität des Claudin-Signals erfolgte mit einem Axiovert 200M Mikroskop mit LSM 510 Modul (Carl Zeiss, Jena, D) und der LSM Image Browser Software (Carl Zeiss, Jena, D).

### **2.2.5.2 Western Blot**

#### **2.2.5.2.1 SDS-PAGE**

Die denaturierende Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionisches Molekül überdeckt die Eigenladungen der Proteine und führt zu einer negativen Gesamtladung des Proteins. Da je nach Länge der Polypeptidkette alle zwei Aminosäuren ein Molekül SDS gebunden wird, nimmt die Anzahl negativer Ladungen mit der Größe des Proteins zu. Ebenfalls kommt es zur Auflösung der Tertiärstruktur der Proteine. Wandern die Proteine nun entlang eines elektrischen Feldes in einer physikalischen Matrix (Polyacrylamid-Gel), werden sie je nach Größe auf ihrem Weg verzögert und so aufgetrennt. In dieser Arbeit wurde die Mini-Protean Tetra Cell (BIORAD, Hercules, US) verwendet. Die Polyacrylamid-Gele bestanden aus einem 6,5-prozentigen Sammelgel und einem 10-prozentigen Trenngel. Der mit Laemmli Puffer versetzte Probeninhalt wurde vollständig in die Sammelgel-Taschen pipettiert. Als Marker diente der PageRuler

Plus (Thermo Scientific, Waltham, US). Das während der Passage des Sammelgels angelegte elektrische Feld bei einer Spannung von 90 V wurde von einer Spannungsquelle (E865, Consort, Turnhout, BEL) generiert. Nachdem die Bromphenolblau-Bande das Trenngel erreichte, wurde die Spannung auf 100 V erhöht und die Gelelektrophorese für weitere 90 Minuten fortgesetzt.

#### 2.2.5.2.2 Blotting

Der Western Blot ist eine standardisierte Methode zum Transfer eines geleelektrophoretisch aufgetrennten Proteingemisches auf eine Membran. Die Proteine sind somit einer Bindung mit Antikörpern zugänglich und können über Chemilumineszenz-Reaktionen quantitativ analysiert werden. In diesem Versuchsansatz wurde ebenfalls die Mini-Protean Tetra Cell (BIORAD, Hercules, US) eingesetzt. Als Membran diente eine Nitrocellulose-Membran (NC 45, Serva, Mannheim, D) mit 0,45 µm Porengröße. Die Membran wurde mit Filtern, Proteingelen und Filzkompressen für 15 Minuten in Tank-Blot-Puffer äquilibriert. Dann wurde die Western Blot Kammer luftblasenfrei unter besonderer Beachtung der Reihenfolge Kathode-Gel-Membran-Anode zusammengesetzt und mit Tank-Blot-Puffer befüllt. Der eigentliche Vorgang des Blottens wurde mit einer konstanten Stromstärke von 500 mA über 75 Minuten durchgeführt. Als Spannungsquelle diente erneut eine E865 (Consort, Turnhout, BEL). Zur Kontrolle des erfolgten Proteintransfers wurde die Nitrocellulose-Membran mit Ponceau-Rot gefärbt. Die Membran wurde zugeschnitten und aufgrund ihrer hohen Affinität zu Proteinen für eine Stunde mit 5% Magermilchpulver in TBS-T abgesättigt. Nach kurzem Waschen der Membran mit TBS-T wurde diese mit der entsprechenden Primärantikörper-Verdünnung (Tabelle 8) bei 4° C über Nacht auf einer bewegten Ablage (Select Bioproducts, Edison, US) inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran erneut mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde mit der Sekundärantikörper-Verdünnung (Tabelle 8) bei Raumtemperatur inkubiert.

Antikörper	Antigen	Verdünnung	Verdünnungslösung	Wirtstier	Firma
Primär	Maus Claudin 2	1:2000	1% BSA in TBS-T	Kaninchen	Life Technologies
Sekundär	Kaninchen IgG	1:50000	1% BSA in TBS-T	Ziege	Life Technologies

Tabelle 8  
Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Detektion des Zielproteins im Western Blot.

Nach erneutem Waschen der Membran mit TBS-T erfolgte die Analyse am Lumineszenz-Analysator (LAS 3000 mini, Fuji Photo Film, Düsseldorf, D) mit dem Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Für die Quantifizierung der erhobenen Ergebnisse wurde eine Normalisierung mit dem stabil exprimierten Protein  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Dazu wurde die analysierte Membran mit TBS-T gewaschen und für eine weitere Nacht mit dem Primärantikörper für  $\beta$ -Aktin (Tabelle 9) bei 4° C inkubiert. Die Membran wurde anschließend gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 9) inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurde die Membran schließlich erneut am Lumineszenz-Analysator (LAS 3000 mini, Fuji Photo Film, Düsseldorf, D) analysiert.

Antikörper	Antigen	Verdünnung	Verdünnungslösung	Wirtstier	Firma
Primär	Maus $\beta$ -Aktin	1:1000	1% BSA in TBS-T	Kaninchen	Cell signaling
Sekundär	Kaninchen IgG	1:50000	1% BSA in TBS-T	Ziege	Life Technologies

Tabelle 9

Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Detektion eines konstant exprimierten Proteins ( $\beta$ -Aktin) im Western Blot.

#### 2.2.5.2.3 Auswertung

Zur Auswertung der digitalisierten Membranen wurden die Programme Image J (1.47i, National Institutes of Health, US) und Excel (2010, Microsoft, US) verwendet. Das jeweilige Molekulargewicht der spezifisch gebundenen Proteinbanden wurde mit dem Größenstandard (PageRuler Plus, Thermo Scientific, Waltham, US) ermittelt und mit Daten von Genecards.org verglichen. Nur die eindeutig dem gesuchten Protein zuzuordnenden Banden wurden für die semiquantitative Auswertung herangezogen. Die digitalisierten Banden wurden mit Image J nach Größe und Intensität analysiert und für den Hintergrund korrigiert (Abbildung 16). Die erhaltenen prozentualen Flächenwerte des Claudin 2 Signals wurden dann in Excel 2010 (Microsoft, US) zu den entsprechenden prozentualen Flächenwerten des  $\beta$ -Aktin Signals relativiert.

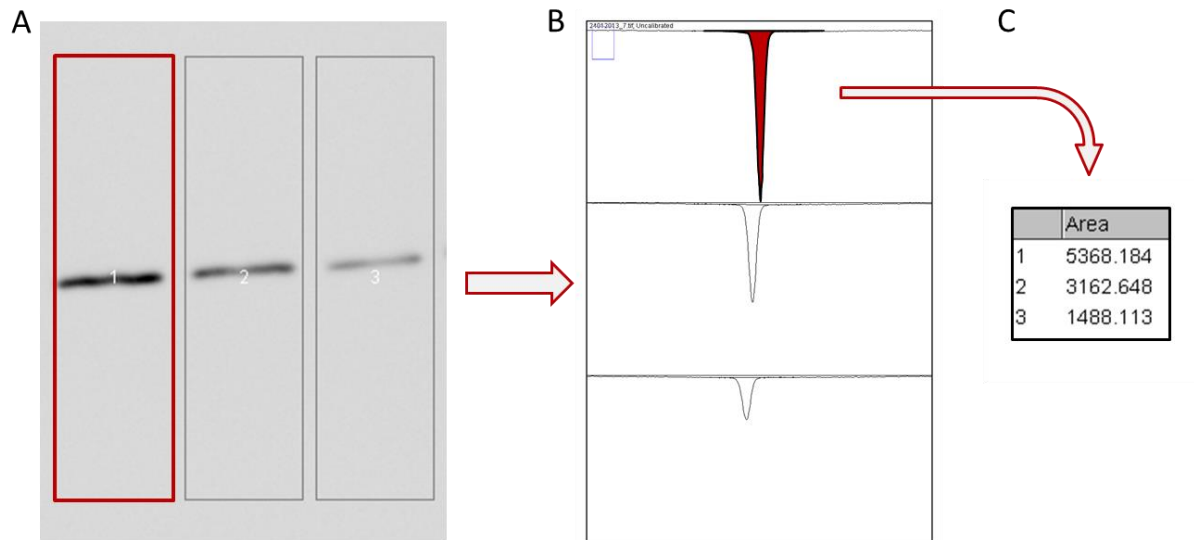


Abbildung 16

Exemplarische Darstellung einer Western Blot-Analyse mit Image J.

- A. Markierung der spezifischen Banden.
- B. Analyse der Banden nach Intensität und Größe sowie Korrektur von Bande 1 hinsichtlich des bestehenden Hintergrundsignals.
- C. Bestimmung der Fläche unter dem Graphen (AUC).

### 2.3 Datenanalyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte unter Verwendung der GraphPad Prism 6 Software (Version 6.04, San Diego, US) sowie Excel 2010 (Microsoft, Redmond, US). Alle Replikate einer Testeinheit (n) wurden unter Bildung des arithmetischen Mittels für die jeweilige Stichprobe herangezogen. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% festgelegt. Der Vergleich einzelner Werte zweier unabhängiger Stichproben erfolgte mit dem zweiseitigen, ungepaarten T-Test. Für den Vergleich von drei oder mehr Stichproben wurde bei Normalverteilung der einzelnen Stichproben eine Ein-Faktor-ANOVA durchgeführt. Für die individuelle Analyse der Stichproben untereinander wurde anschließend der Tukey Test eingesetzt. Nicht normalverteilte Stichproben ( $\geq 3$ ) wurden mit dem nicht parametrischen Kruskal-Wallis Test analysiert. Eine Prüfung auf Varianzgleichheit erfolgte mit dem Barlett's- und dem Brown-Forsythe Test. Bei Varianzheterogenität erfolgte die Auswertung mittels korrigierten T-Tests nach Bonferroni. Die Darstellung der Daten erfolgt in arithmetischen Mittelwerten mit den jeweiligen Standardfehlern. Das Erreichen und Überschreiten des Signifikanzniveaus wurde mit einem \* signalisiert.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Analyse der parazellulären Eigenschaften nativer proximaler Tubuli

Um unterschiedliche Einflüsse auf den parazellulären Weg des proximalen Tubulus bestimmen zu können, war die Evaluation der parazellulären Eigenschaften des nativen proximalen Tubulus notwendig. Zudem wurde die Expression von Claudinen analysiert, da sie im Wesentlichen die parazellulären Eigenschaften eines Epithels determinieren.

##### 3.1.1 Tubulusperfusion

Für die elektrophysiologische Evaluation nativer proximaler Tubuli wurden einzelne Segmente des proximalen Tubulus mittels isolierter Perfusion untersucht. Die Unterteilung der Segmente erfolgte nach Lokalisation und histomorphologischen Kriterien in PCT, S2 und S3. Mikroskopisch zeigten S3 Segmente vom Übergang des Außenstreifens der äußeren Medulla ein annähernd kubisches Zellbild mit prominenten Mikrovilli. Im Bereich der S2 Segmente kam es unter vergleichender Betrachtung zu einem deutlichen Abflachen des Epithels sowie des luminalen Bürstensaumbesatzes. Die kortikal und oberflächennah dissezierten PCT zeigten mikroskopisch einen gebogenen Verlauf mit leichten Einfaltungen (Abbildung 17).

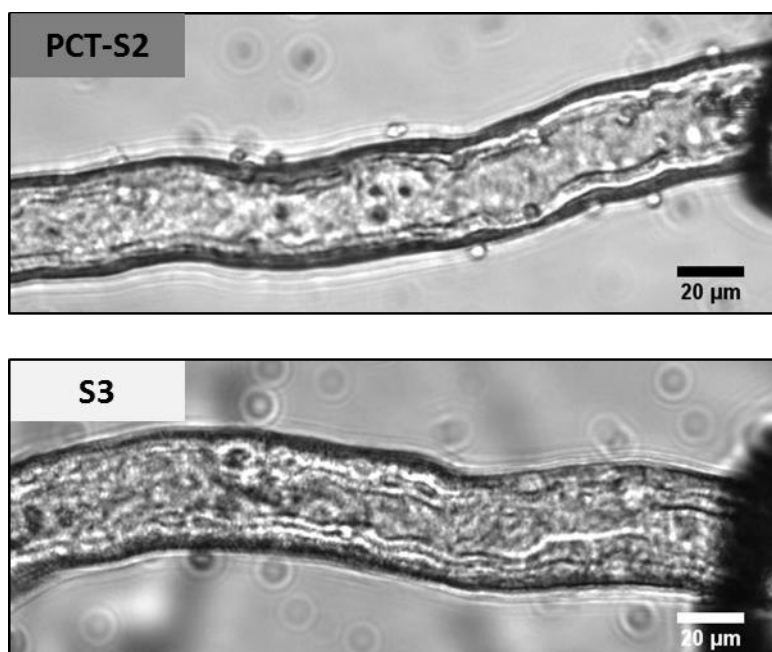


Abbildung 17  
Histomorphologie dissezierter Segmentabschnitte des nativen proximalen Tubulus.

Die Einzelgruppen (PCT, S2 und S3) wurden aufgrund ähnlicher elektrophysiologischer Eigenschaften nach Vorversuchen zu den Hauptgruppen PCT-S2 (n=15) und S3 (n=9) subsummiert und analysiert. Für die Segmente PCT-S2 zeigte sich während der Perfusion kein relevantes transepitheliales Potential. Der transepitheliale Widerstand betrug  $13,02 \pm 1,81 \Omega\text{cm}^2$ . S3 Segmente imponierten hingegen mit einem lumennegativen  $V_{te}$  von  $-1,18 \pm 0,33 \text{ mV}$  und deutlich höherem  $R_{te}$  ( $20,04 \pm 2,91 \Omega\text{cm}^2$ ). Dies resultierte in einem signifikant höheren Kurzschlussstrom mit  $-69,78 \pm 27,32 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (Diagramm 1). Die Untersuchung der beiden Hauptgruppen hinsichtlich ihrer parazellulären Eigenschaften zeigte starke Unterschiede hinsichtlich der Ionenselektivität mit Ausbildung von Diffusionspotentialen unterschiedlicher Polarität (Abbildung 18). Während die proximalen PCT-S2 Segmente mit  $P_{\text{Na/Cl}}$  von  $0,58 \pm 0,02$  eine deutliche Anionenselektivität aufwiesen, zeigten S3 Segmente mit  $P_{\text{Na/Cl}}$  von  $1,37 \pm 0,08$  eher kationenselektive parazelluläre Eigenschaften. Die Erhöhung der Kationenselektivität in den S3 Segmenten war hierbei vor allem auf eine Reduktion der Permeabilität für Chlorid Ionen zurückzuführen. Unterschiede in der Permeabilität für Kationen zeigten sich entlang des nativen proximalen Tubulus hingegen nicht.

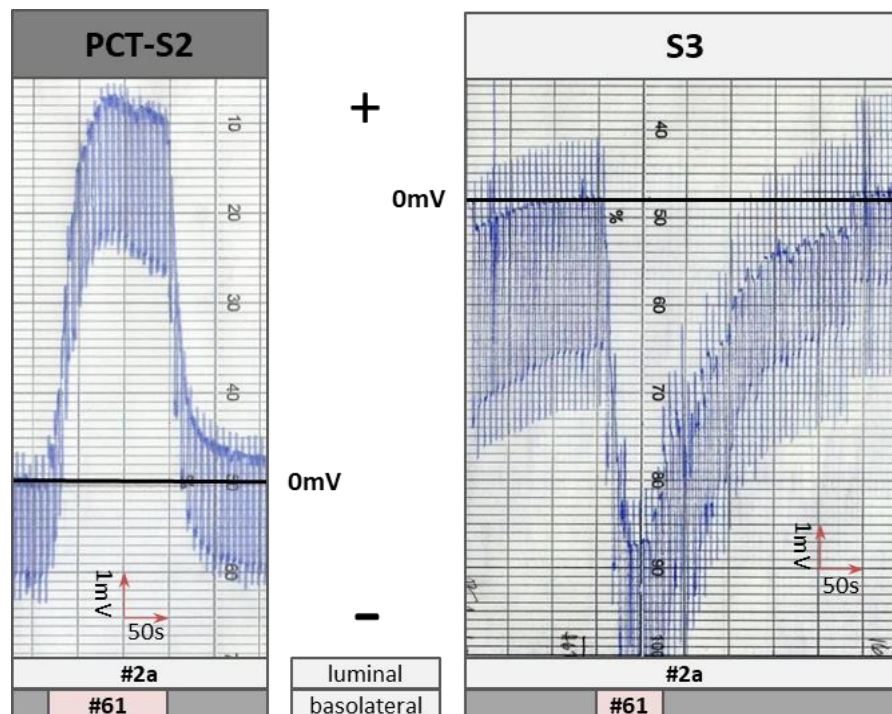
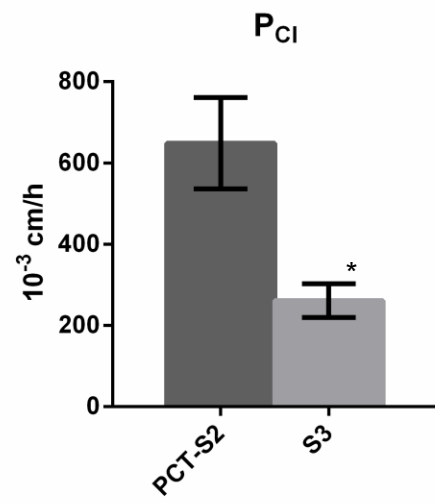
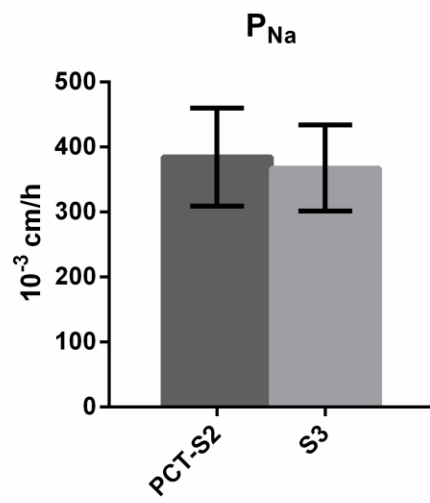
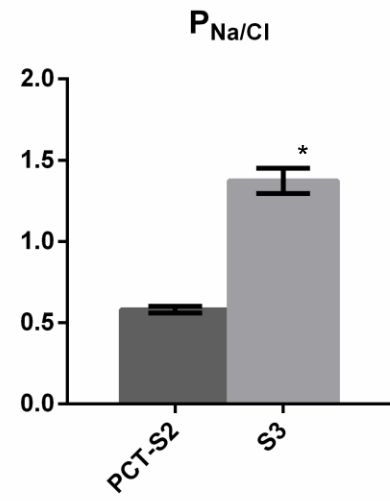
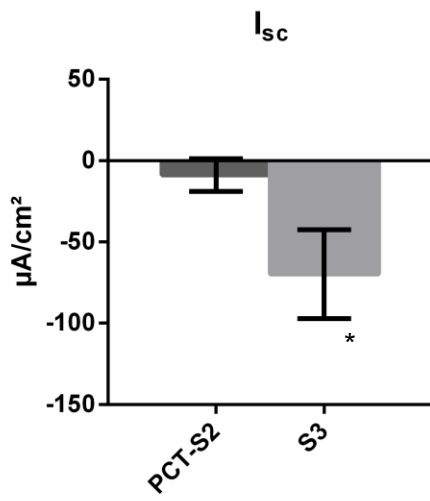
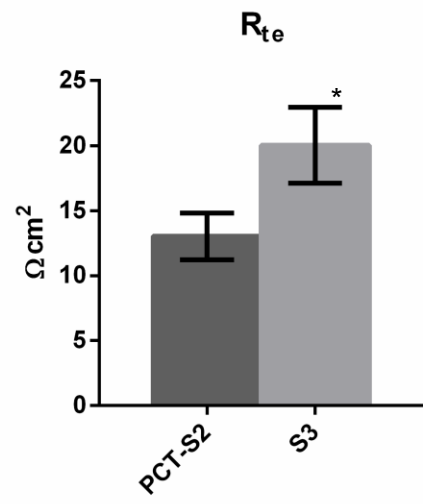
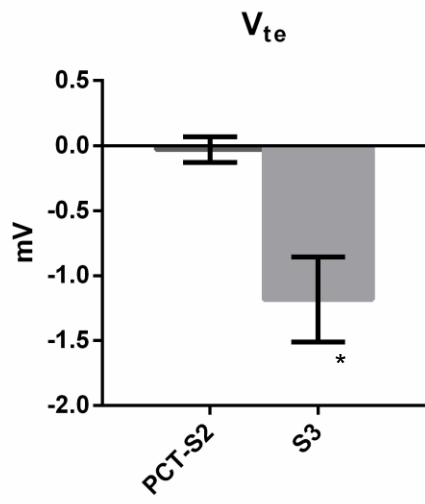


Abbildung 18

Exemplarische Schreiberaufzeichnung der isolierten Tubulusperfusion.

Für das PCT-S2 Segment zeigt sich ein lumenpositives, für das S3 Segment ein deutlich lumennegatives Diffusionspotential unter basolateraler Applikation der Lösung #61.



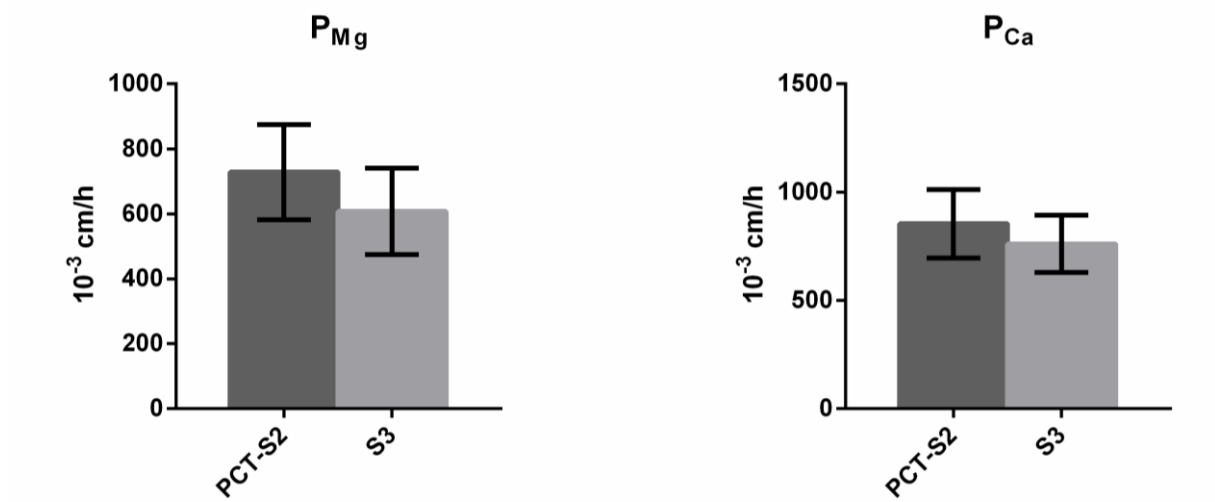
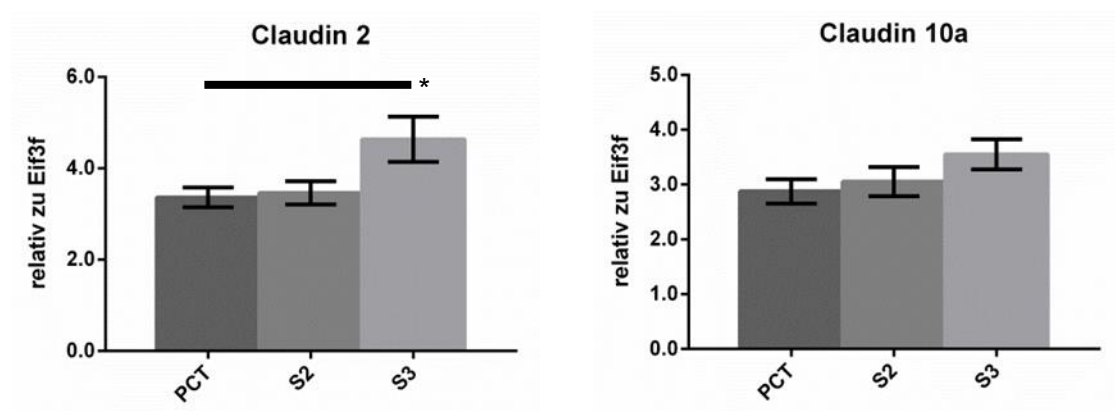


Diagramm 1

Zusammenfassende Darstellung der elektrophysiologischen Eigenschaften von PCT-S2 (n=15) und S3 (n=9) Segmenten.

### 3.1.2 Semiquantitative RT-PCR

Nach elektrophysiologischer Messung am proximalen Tubulus wurden die einzelnen Segmentabschnitte (PCT, S2 und S3) mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Hierbei sollte analysiert werden, ob Unterschiede in der Claudin Expression der einzelnen Segmente bestehen, welche die Reduktion der Permeabilität für Chlorid Ionen sowie den Anstieg des transepithelialen Widerstandes entlang des proximalen Tubulus erklären könnten. Die einzelnen Segmentabschnitte (jeweils n=8) wurden hierzu für die Claudine 2, 10a, 11, 12 und 17 untersucht und zu Eif3f normalisiert (Diagramm 2).



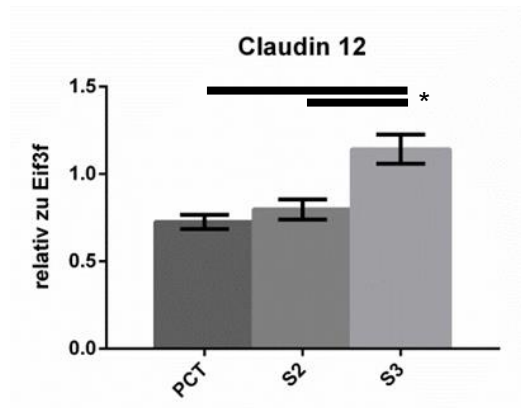


Diagramm 2

Expressionsprofil der Claudin mRNA in einzelnen Segmentabschnitten des proximalen Tubulus (je n=8).

Im Verlauf des proximalen Tubulus zeigte sich ein Anstieg der Expression von Claudin 2 und Claudin 12. Das Signifikanzniveau wurde hierbei insbesondere im direkten Vergleich zwischen PCT und S3 Segmenten erreicht. Zusätzlich konnte eine signifikante Steigerung der Claudin 12 Expression zwischen S2 und S3 Segmenten detektiert werden. Die Expression von Claudin 10a war über alle Segmente stabil. Die Claudine 11 und 17 zeigten insgesamt nur sehr geringe Expressionsraten. Die erhobenen  $C_q$ -Werte konnten im verwendeten Messverfahren nicht mit hinreichender Sicherheit von den Negativkontrollen abgegrenzt werden und wurden daher nicht zur Auswertung herangezogen. Die Expressionsraten der einzelnen Claudine wurden zudem in Relation zueinander betrachtet (Diagramm 3). Diese Darstellung trägt den Verhältnissen in nativen Tight junctions Rechnung, in der unterschiedlichste Claudine miteinander interagieren und in ihrer Gesamtheit die parazellulären Eigenschaften bestimmen. Die Verhältnisse von Claudin 2 zu Claudin 10a sowie Claudin 10a zu Claudin 12 zeigten keine signifikanten Unterschiede. Für das Claudin 2 zu Claudin 12 Verhältnis hingegen konnte eine signifikante Erniedrigung zwischen dem PCT und dem S3 Segment nachgewiesen werden.

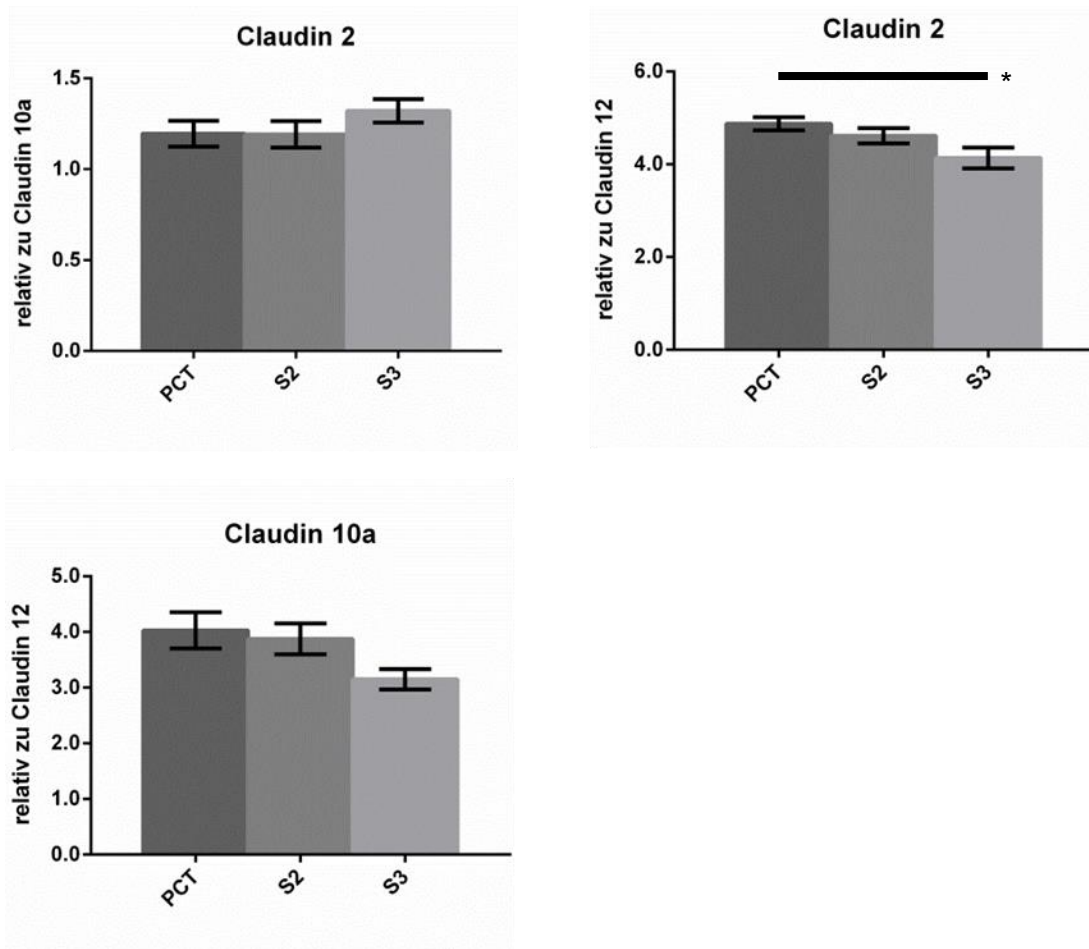


Diagramm 3

Expressionsverhältnisse der mRNA einzelner Claudine von Segmenten nativer proximaler Tubuli (je n=8).

### 3.2 Regulation des parazellulären Weges unter Diät

Um den Einfluss einer kalziumarmen, kalziumreichen oder phosphatreichen Diät auf die parazellulären Eigenschaften des proximalen Tubulus zu untersuchen, erfolgte eine Expressionsanalyse von Claudinen auf RNA- und Proteinebene. Als Ausgangsmaterial für diese Analysen standen isolierte proximale Tubuli und fixierte Nieren von Mäusen unter definierter Diät zur Verfügung, welche im Rahmen einer anderen Versuchsreihe generiert wurden. In dieser Versuchsreihe sollte die Regulation des parazellulären Weges der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (*engl.: thick ascending limb, TAL*) untersucht werden [36]. C57BL/6J-Mäuse erhielten dazu über eine Woche Spezialfutter mit definierter Zusammensetzung für Kalzium und Phosphat (siehe 2.1.2). Die Versuchstiere tolerierten das Experimentalfutter unter den Versuchsbedingungen gut. Die laborchemischen Analysen zeigten unter oraler Kalziumbelastung eine nur insuffiziente Kompensation der Versuchstiere mit

deutlich erhöhter Plasmakalziumkonzentration trotz gesteigerter FE von Kalzium (Tabelle 10). Als Zeichen einer supprimierten Freisetzung von PTH im Rahmen der erhöhten Kalziumkonzentration zeigte sich zudem eine reduzierte FE von Phosphat. In der Phosphat Diät zeigte sich entsprechend eine Erhöhung der fraktionellen Exkretion von Phosphat. Als leichte Tendenz wurde eine Erniedrigung der fraktionellen Exkretion von Kalzium bei erhöhter fraktioneller Exkretion von Phosphat in der Niedrig Kalzium Diät festgestellt. Diese Tendenz erreichte zwar nicht das Signifikanzniveau, könnte aber im Sinne einer PTH-Stimulation als physiologische Anpassungsreaktion auf einen Kalziummangel zurückzuführen sein.

Diät	n	Plasmakonzentration		Fraktionelle Exkretion	
		Kalzium <i>mM</i>	Phosphat <i>mM</i>	Kalzium %	Phosphat %
<b>Kontrolle</b>	7	2,28 ± 0,02	2,66 ± 0,25	0,5 ± 0,09	16,0 ± 1,80
<b>Niedrig Kalzium</b>	5	2,22 ± 0,03	2,42 ± 0,16	0,3 ± 0,02	35,6 ± 4,51 *
<b>Hoch Kalzium</b>	7	2,41 ± 0,04 *	2,89 ± 0,28	2,0 ± 0,37 *	6,4 ± 1,28 *
<b>Hoch Phosphat</b>	7	2,31 ± 0,05	3,37 ± 0,21	0,4 ± 0,05	59,2 ± 7,21 *

Tabelle 10

Plasmakonzentrationen und fraktionelle Exkretionen der diätetisch eingestellten C57BL/6J-Mäuse. Signifikante Änderungen gegenüber der Kontrollgruppe sind mit einem \* markiert

### 3.2.1 Semiquantitative Expressionsanalyse mittels RT-PCR

In Voruntersuchungen an der TAL zeigten sich regulative Vorgänge zur Anpassung an eine erhöhte orale Kalziumbelastung durch Alteration der Claudin Expression [35, 36]. Ob ähnliche Systeme auch im proximalen Tubulus bestehen, sollte zunächst mittels semiquantitativer RT-PCR auf mRNA-Ebene untersucht werden. Proximale Tubuli von C57BL/6J Mäusen unter Spezialdiät (siehe 3.2) wurden hierzu auf ihren Gehalt an Claudin 2, 10a, 12 und 17 mRNA hin analysiert und jeweils zu den Haushaltsgenen  $\beta$ -Actin und Eif3f normalisiert. Die Auswertung der semiquantitativen RT-PCR ist für die untersuchten Claudine in Diagramm 4 dargestellt. Eine Erhebung der  $C_q$ -Werte mit sicherer Abgrenzung zu den Negativkontrollen konnte in isolierten proximalen Tubuli für die Claudine 2, 10a und 12 erfolgen. Claudin 17 wurde hingegen so schwach exprimiert, dass eine sichere Abgrenzung der erhobenen  $C_q$ -Werte in der Datenanalyse von den NTC und NRTC nicht möglich war. Es zeigte sich

für die mRNA Expression von Claudin 2, 10a und 12 in der erhobenen Stichprobe (n=5 pro Diät) keine signifikante Änderung.

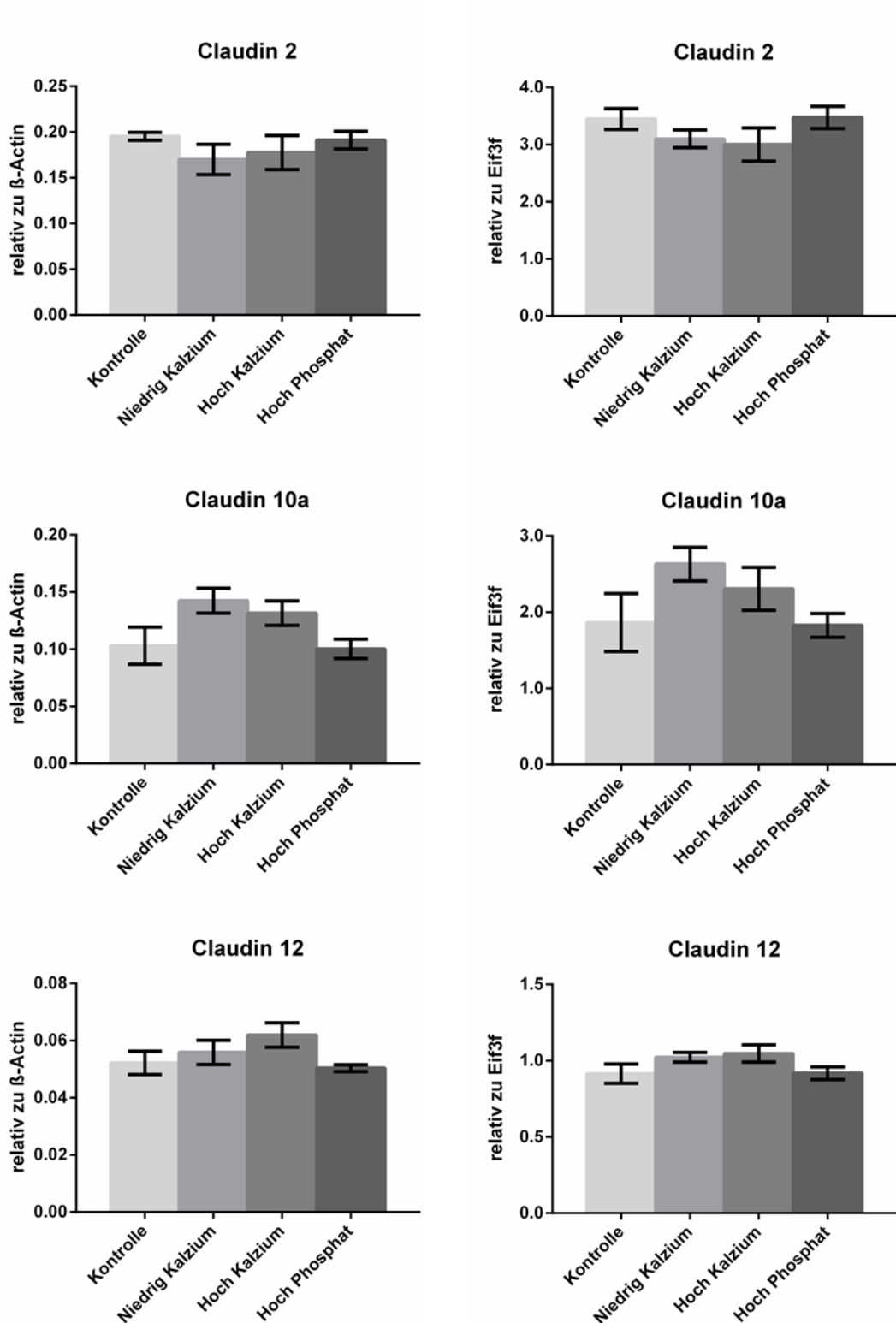


Diagramm 4  
Expressionsanalyse der Claudin 2, 10a und 12 mRNA in proximalen Tubuli (je n=5) nach einwöchiger Diät.



Um der Komplexität der parazellulären Barriere als Interaktionsort unterschiedlichster Claudine gerecht zu werden, wurde erneut das Expressionsverhältnis der einzelnen Claudine untereinander betrachtet (Diagramm 5). Hierbei zeigte sich in der Niedrig Kalzium Diät eine Reduktion des Claudin 2 - Claudin 10a (0,58-fach) sowie des Claudin 2 - Claudin 12 (0,87-fach) Quotienten im Vergleich zur Kontroll Diät. Die Hoch Kalzium Diät wies im Vergleich zur Kontroll Diät eine signifikante Reduktion des Claudin 2 - Claudin 12 (0,74-fach) Quotienten auf.

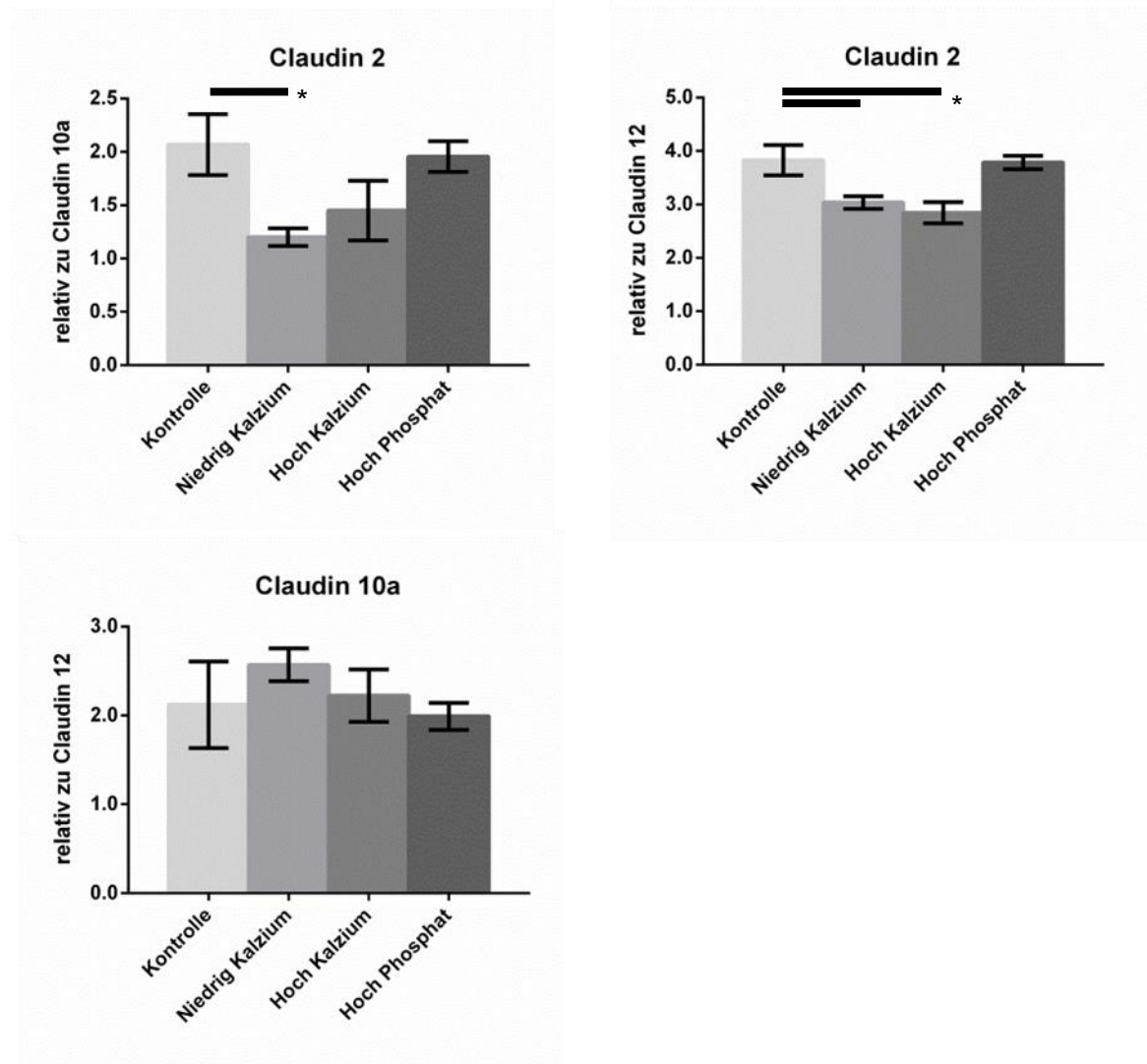


Diagramm 5

Expressionsverhältnisse der Claudin 2, 10a und 12 mRNA im proximalen Tubulus (je n=5) nach einwöchiger Diät.

### 3.2.2 Semiquantitative Expressionsanalyse mittels Western Blot

Die mittels semiquantitativer RT-PCR erhobenen indirekten Hinweise auf eine veränderte Expression der Claudine wurden in einem weiteren Schritt auf Proteinebene überprüft. Mittels Western Blot erfolgte eine semiquantitative Analyse der Expression von Claudin 2 in isolierten proximalen Tubuli der verschiedenen Kalzium- und Phosphat-Diäten (Kontroll Diät n=7, Niedrig Kalzium Diät n=6, Hoch Kalzium Diät n=7, Hoch Phosphat Diät n=7). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 19 zusammenfassend graphisch dargestellt.

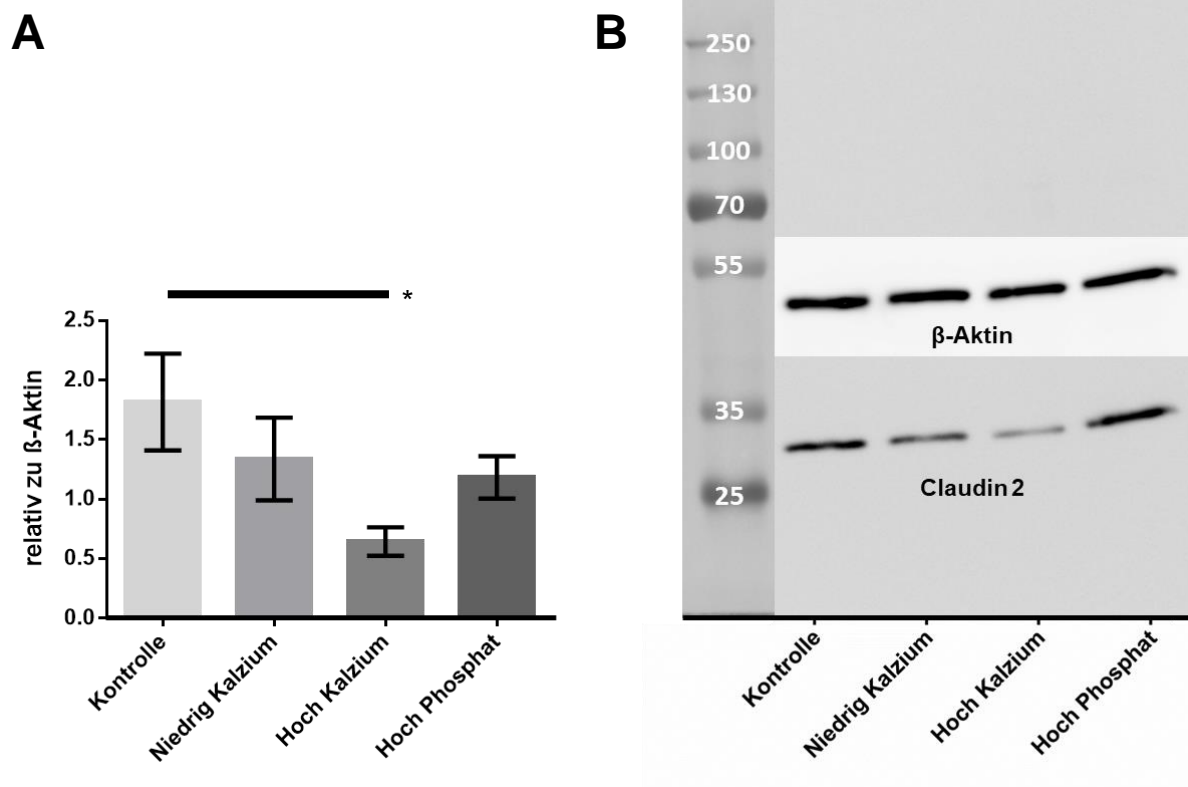


Abbildung 19

Darstellung der adaptiven Regulation der Claudin 2 Proteinmenge im Rahmen des Diätversuches.

- A. Graphische Darstellung der semiquantitativen Analyse der Claudin 2 Expression mittels Western Blot. (Kontroll Diät n=7, Niedrig Kalzium Diät n=6, Hoch Kalzium Diät n=7, Hoch Phosphat Diät n=7)
- B. Originaldaten einer analysierten Western Blot-Membran.

Es zeigten sich für die Niedrig Kalzium sowie Hoch Phosphat Diät keine signifikanten Änderungen der Proteinmenge von Claudin 2. In der Hoch Kalzium Diät ( $0,64 \pm 0,12$ ) konnte im Rahmen der Analyse jedoch eine signifikante Reduktion der Proteinmenge an Claudin 2 im Vergleich zur Kontroll Diät ( $1,82 \pm 0,41$ ) nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Immunfluoreszenzanalysen

Neben unterschiedlicher Expression können membranständige Proteine einer Internalisierung in submembranöse Vesikel unterliegen. Diese adaptive räumliche Umverteilung kann auf zellulärer Ebene zu einem Funktionsverlust von Proteinen unter gleichbleibender Proteinmenge führen. Ob Claudin 2 in den unterschiedlichen Diättieren einem solchen „Membran-Trafficking“ unterworfen ist, wurde mittels Immunfluoreszenz-Technik näher untersucht (Abbildung 20 und Abbildung 21). In kortikalen Abschnitten angefertigter Präparate zeigte sich unabhängig von den diätetischen Bedingungen ein eher schwaches Fluoreszenzsignal für Claudin 2. Die größte Ausprägung erreichte das kortikale Fluoreszenzsignal in diskontinuierlicher Verteilung entlang der Schlussleisten der Bowman-Kapsel. In TJ von PCT und S2 Segmenten zeigte sich eine deutlich geringere Intensität eines punktförmig imponierenden Fluoreszenzsignals für Claudin 2. Unter identischer Belichtungszeit zeigte sich im Außenstreifen des Nierenmarkes eine auffällige Zunahme der Intensität des Fluoreszenzsignals, welche rein morphologisch von einem linien- bis schleifenförmigen, junktionalen Claudin 2 Signal entsprechend größerer Kontinuität begleitet wurde. Im Übergangsbereich der absteigenden dünnen Schleifen des Intermediärtubulus zeigte sich das stärkste Fluoreszenzsignal in allen untersuchten Nephronabschnitten mit einem mäanderartigen bis krausen, junktionalen Erscheinungsbild. Ein zytosolisches Fluoreszenzsignal konnte in den analysierten Schnitten nicht gesichert werden. Dedizierte Hinweise für eine funktionelle Regulation von Claudin 2 mittels Internalisierung in submembranöse Vesikel fanden sich somit in den analysierten Schnitten nicht. Im Diätversuch zeigte eine vergleichende Betrachtung kortikaler sowie medullärer Schnitte hinsichtlich Intensität, Lokalisation und Morphologie des Fluoreszenzsignals für Claudin 2 zudem keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kalzium oder Phosphat Diäten.

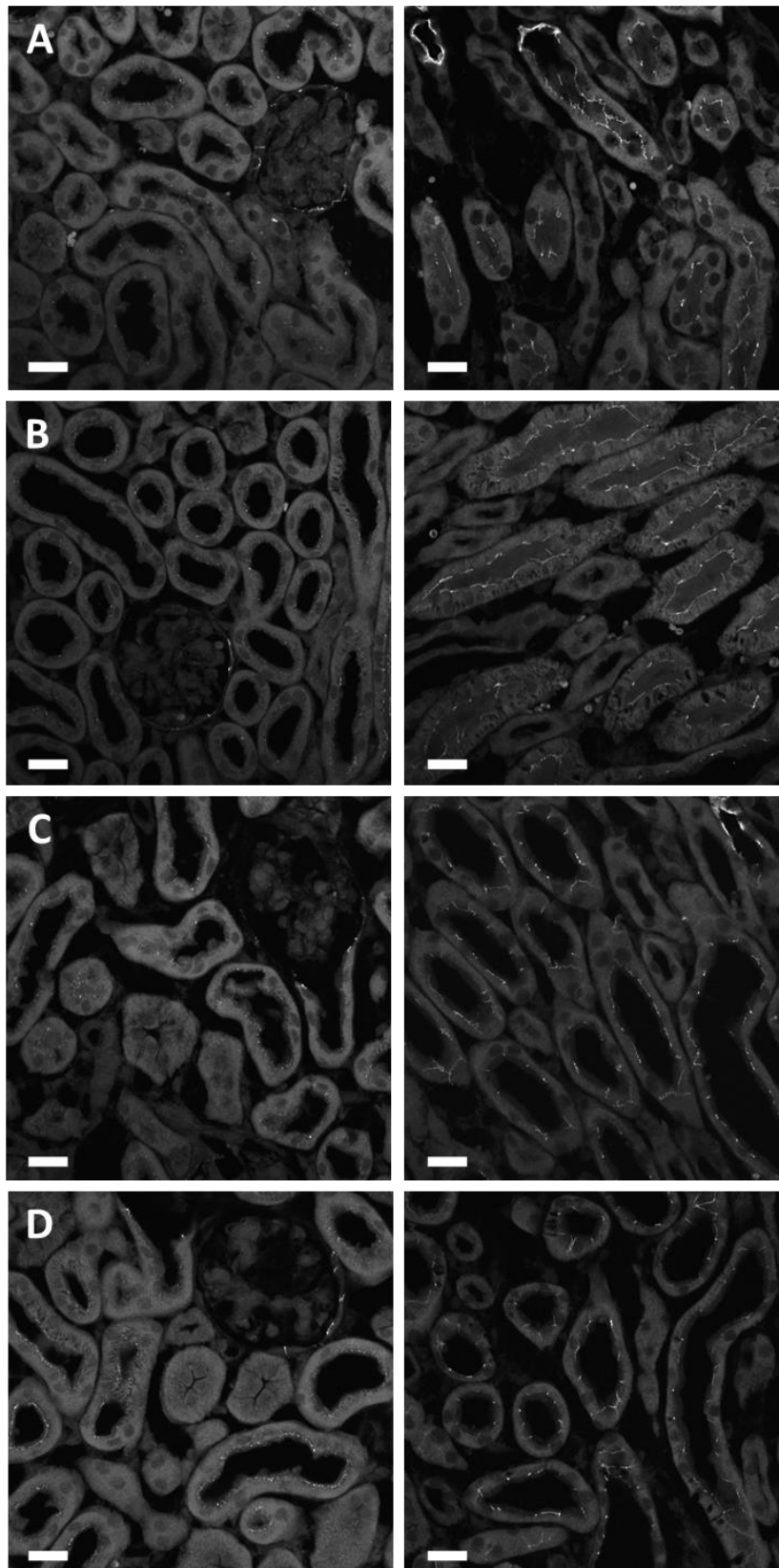


Abbildung 20

Immunfluoreszenzfärbungen kortikaler (links) sowie medullärer (rechts) Schnittbilder für Claudin 2 in der Übersichtsaufnahme. Vergleichende Darstellung im Diätversuch.

(A. Kontroll Diät; B. Hoch Kalzium Diät; C. Niedrig Kalzium Diät; D. Hoch Phosphat Diät). Maßstabsbalken entsprechen 20 µm.

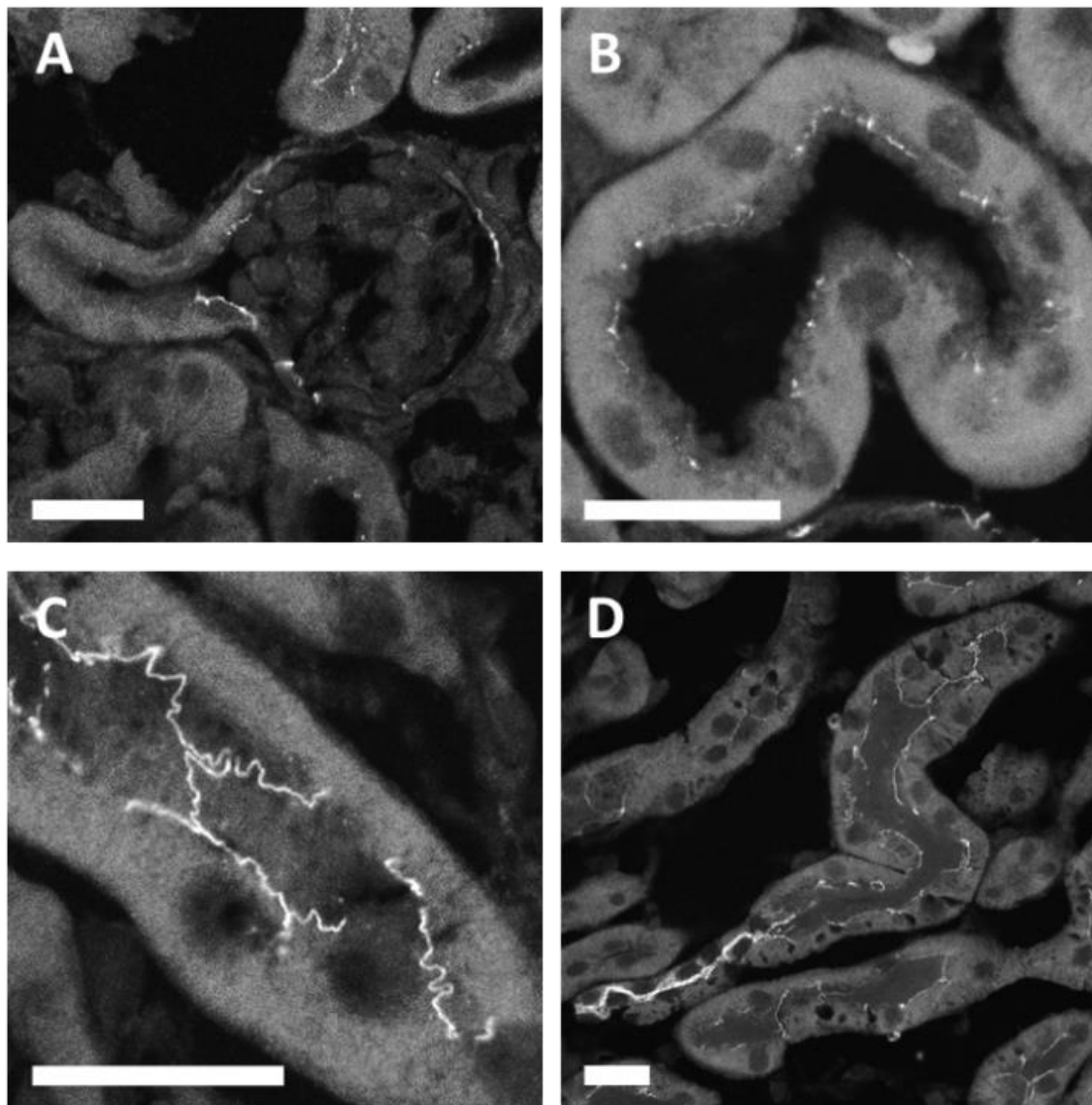


Abbildung 21

Detailaufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 2 in unterschiedlichen Segmenten des Nephrons.

- A. Glomerulum mit Abgang des S1 Segmentes
- B. S2 Segment des proximalen Tubulus
- C. Medulläres S3 Segment des proximalen Tubulus
- D. Übergang des S3 Segmentes des proximalen Tubulus in die dünne absteigende Schleife des Intermediärtubulus.

Maßstabsbalken entsprechen 20 µm.

### 3.3 Primärzellkultur

Die weitere Überprüfung einer regulierten Claudin Expression im proximalen Tubulus wurde *in vitro* an einer Zellkultur durchgeführt. Dieses Modell bietet die Möglichkeit proximale Tubuluszellen gezielt (z.B. über hormonelle Stimuli) zu manipulieren. Die resultierenden Effekte einer solchen Manipulation können zudem ohne interferierende Kompensationsmechanismen des Gesamtorganismus erfasst werden. Der Ansatz als Primärzellmodell sichert unter optimalen Bedingungen eine Konservierung aller Eigenschaften eines präparierten Zellmaterials *in vivo*. Besondere Relevanz hat dies für den Erhalt der elektrophysiologischen parazellulären Eigenschaften eines Epithels.

Als Grundlage für die Etablierung einer Primärzellkultur diente die Beobachtung, dass proximale Tubulussegmente über einen Zeitraum von acht Tagen kommunizierende Kolonien auf unbeschichteten Petrischalen ausbilden (Abbildung 22).

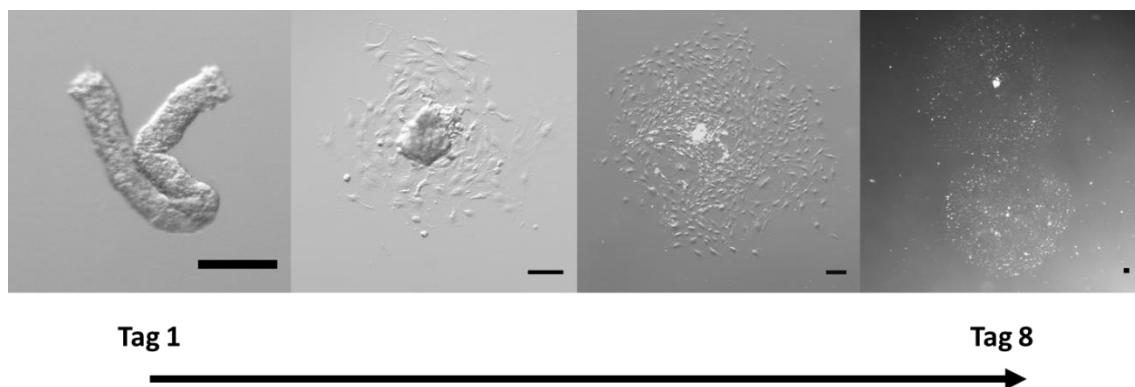


Abbildung 22

Auswachsen isolierter proximaler Tubulussegmente.

Isolierte Tubulussegmente desintegrieren in wenigen Tagen. Die einzelnen Zellen wachsen aus den Enden von Tubulussegmenten aus und adhären an den Petrischalen. Über einen Zeitraum von acht Tagen formieren sich so schließlich Zellkolonien, welche in peripheren Bereichen miteinander in Kontakt treten.

Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

Da die einzelnen Tubuluszellen hierbei aus den Enden der Tubulussegmente auswachsen, wurden die isolierten Tubulusfragmente für die Zellkultivierung weiter zerkleinert, um eine möglichst große Oberfläche für das Auswachsen der proximalen Tubuluszellen zu schaffen. Als mögliche Optionen zur Zerkleinerung der einzelnen Tubulusfragmente wurden orientierend mechanische sowie enzymatische Methoden getestet. Hierzu wurden einzelne proximale Tubulussegmente entweder durch scharf geschliffene Pinzetten mechanisch zerkleinert oder durch 30-minütige Inkubation in

Collagenase II (2,2 mg/ml) und Hyaluronidase (2 mg/ml) enzymatisch verdaut. Die zerkleinerten Tubulussegmente wurden dann auf Transwell Filtereinsätzen ausgesät und in regelmäßigen Abständen mittels EVOM evaluiert (Diagramm 6). Enzymatisch verdaute proximale Tubulussegmente zeigten unter Kulturbedingungen einen steilen Anstieg des transepithelialen Widerstandes. Das Maximum des  $R_{te}$  wurde bereits am sechsten Tag erreicht. Mechanisch verdaute proximale Tubulussegmente zeigten einen verzögerten Anstieg des transepithelialen Widerstands und erreichten ein deutlich niedrigeres Maximum des  $R_{te}$  erst nach 16 tägiger Kultivierung. Im Hinblick auf eine potentielle Entdifferenzierung der Primärzellen unter verlängerter Kultivierung wurden folglich enzymatische Verdaumethoden für das Zellmodell eingesetzt.

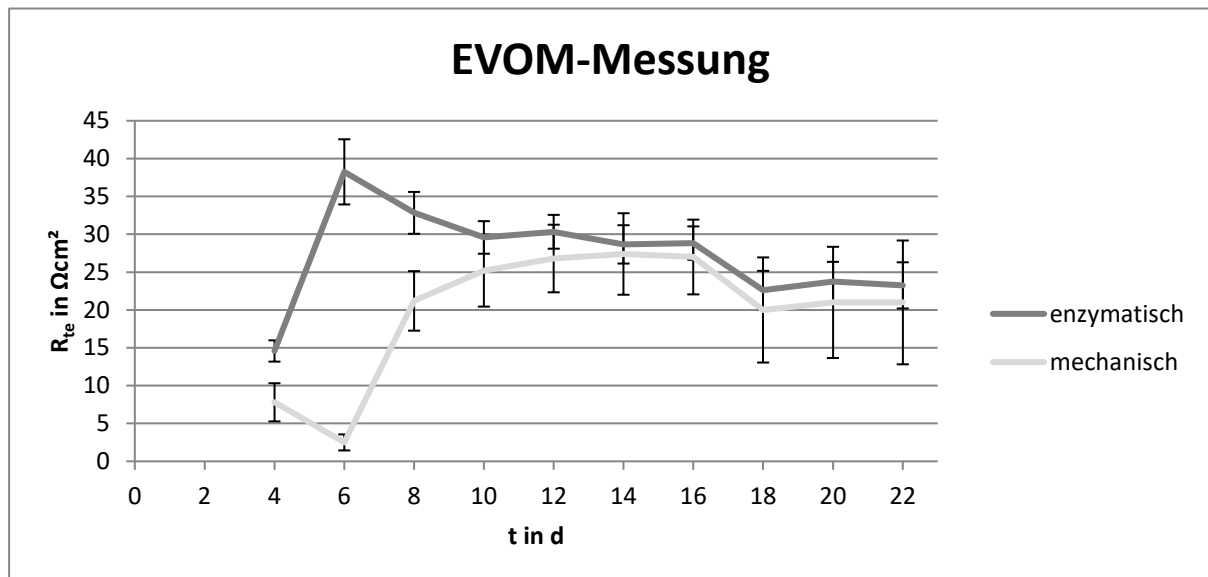


Diagramm 6

Vergleichende Darstellung von  $R_{te}$ -Messungen mechanisch sowie enzymatisch zerkleinerter proximaler Tubulussegmente im zeitlichen Verlauf mittels EVOM.

Für die Kultivierung proximaler Tubuluszellen gibt es in publizierten Versuchen keine einheitlichen Angaben zur optimalen Zusammensetzung eines Kulturmediums. Neben einem Basismedium (DMEM oder DMEM/F12) mit antimikrobiellen Pharmaka wurden unterschiedliche Zusätze beschrieben und für die Kultivierung primärer proximaler Tubuluszellen verwendet. Die Basismedien unterscheiden sich dabei stark in ihrer Glucosekonzentration. DMEM weist in seiner Niedrig-Glucose-Formulierung lediglich 5,55 mM Glucose auf, wohingegen in DMEM/F12 Glucose in einer Konzentration von 25 mM vorliegt. Da sich Änderungen im transzellulären Transport und der parazellulären Struktur humaner proximaler Tubuluszellen unter

Kultivierung mit hohen Glucosespiegeln zeigten [57], wurde für die Kultivierung der mpPTEC lediglich DMEM in der Niedrig-Glucose-Formulierung verwendet. Publierte Zusätze für die Kultur von proximalen Tubuluszellen sind Insulin, Transferrin, Selen und Hydrokortison. Ihre Relevanz sollte im Rahmen der Etablierung des Zellmodells orientierend untersucht werden. Isolierte proximale Tubulusfragmente wurden hierzu auf unbeschichteten Petrischalen in Basismedium (DMEM 5,55 mM Glucose, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin) mit und ohne ITS X100 Zellkulturzusatz (1% v/v) ausgesät und das Wachstum über 30 Tage beurteilt. Unter Stimulation mit dem Zusatz ITS X100 zeigten sich im Beobachtungszeitraum deutlich größere Zellkolonien. Diese konnten unter Kulturbedingungen zudem früher Kontakt zu anderen Zellkolonien aufbauen und blieben über die Dauer des Beobachtungszeitraumes länger vital (Abbildung 23). Für das angestrebte Primärzellmodell wurde daher aufgrund der potentiell schneller erreichbaren Konfluenz der Zusatz ITS X100 verwendet.

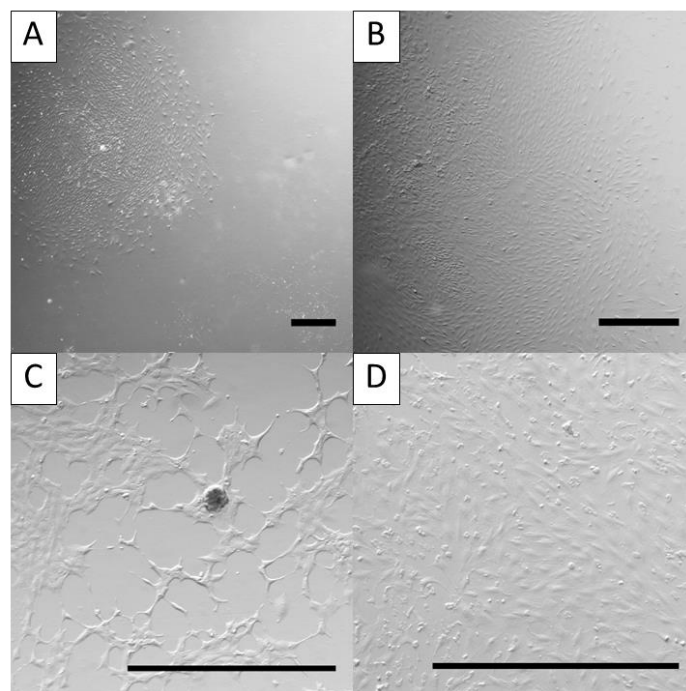


Abbildung 23

Kultivierung von proximalen Tubulusfragmenten mit (B/D) und ohne (A/C) ITS X100.

Durch den ITS Zusatz gerieten die einzelnen Zellkolonien in der Übersichtsaufnahme schneller in Kontakt zueinander (B). Unter längerer Kultivierungsdauer von 18 Tagen zeigte sich eine deutliche Desintegration der Kolonien. Diese war unter dem Zellzusatz ITS X100 weniger stark ausgeprägt (D). Maßstabsbalken entsprechen 500 µm.



Um den Einfluss von Kortikosteroiden auf die Kultivierung proximaler Tubuluszellen zu untersuchen, wurden mpPTEC auf Transwell Filtereinsätzen über sieben Tage mit und ohne 50 nM Hydrokortison zusätzlich zum Basismedium kultiviert. Die Messung des transepithelialen Widerstandes mittels EVOM zeigte in dieser kleinen, orientierenden Versuchsreihe einen erhöhten Widerstand in Filtern, welche additiv mit Hydrokortison kultiviert wurden. So wurde am vierten Kultivierungstag der Widerstand in Hydrokortison-freien Filtern mit  $7,51 \Omega\text{cm}^2 \pm 0,41$  im Vergleich zu  $13,04 \Omega\text{cm}^2 \pm 1,63$  bestimmt. Am sechsten Kultivierungstag war der transepitheliale Widerstand in Hydrokortison-freien Filtern mit  $13,53 \Omega\text{cm}^2 \pm 1,33$  weiterhin unter dem Niveau von Hydrokortison versetzten Filtern mit  $19,8 \Omega\text{cm}^2 \pm 1,16$ . Die Analyse der unterschiedlichen Filter in der Ussing-Kammer konnte den unter Kulturbedingungen gemessenen, erhöhten transepithelialen Widerstand in den mit Hydrokortison versetzten Filtern trotz persistierender Tendenz nicht verifizieren. Wie in Tabelle 11 ersichtlich zeigten sich in dieser kleinen Stichprobe keine Hinweise auf Unterschiede hinsichtlich  $V_{te}$ ,  $I_{sc}$  und Permeabilitäten.

Kultivierungszusatz	$R_{te}$		$V_{te}$	$I_{sc}$	$P_{Na/Cl}$
	$n$	$\Omega\text{cm}^2$	$mV$	$\mu A/\text{cm}^2$	
Kein Hydrokortison	4	$12,38 \pm 1,68$	$0,26 \pm 0,02$	$-4,8 \pm 2,59$	$1,09 \pm 0,06$
50 nM Hydrokortison	4	$16,16 \pm 1,42$	$0,3 \pm 0,01$	$-3,93 \pm 0,77$	$1,22 \pm 0,03$

Kultivierungszusatz	$P_{Na}$		$P_{Cl}$	$P_{Ca}$	$P_{Mg}$
	$n$	$10^{-3} \text{ cm/h}$	$10^{-3} \text{ cm/h}$	$10^{-3} \text{ cm/h}$	$10^{-3} \text{ cm/h}$
Kein Hydrokortison	4	$423,65 \pm 57,52$	$394,67 \pm 64,56$	$858,22 \pm 113,38$	$807,68 \pm 110,69$
50 nM Hydrokortison	4	$331,15 \pm 27,96$	$273,99 \pm 30,48$	$688,22 \pm 56,88$	$635,01 \pm 53,92$

Tabelle 11  
Vergleichende elektrophysiologische Analyse von mpPTEC mit und ohne 50nM Hydrokortison in der Ussing-Kammer.

Da ein Anstieg des transepithelialen Widerstandes unter Kultivierung mit 50 nM Hydrokortison auf Entdifferenzierung der Primärzellen zurückzuführen sein könnte, wurden zusätzlich Immunfluoreszenzanalysen der kultivierten Filter durchgeführt. Hierbei wurde die Expression des für den proximalen Tubulus typischen Claudin 2 näher untersucht. In Hydrokortison-freien Filtern fand sich lediglich in einem von acht kultivierten Filtern ein junktionales Claudin 2 Signal. In Hydrokortison versetzten

Filtern war dies in vier von acht Filtern der Fall. Dieses junctionale Signal war unabhängig vom Zellzusatz von schwacher Intensität und bei Ausbildung nur diskontinuierlich auf den Filtern zu finden. Zusammenfassend ist der Effekt von 50 nM Hydrokortison auf die Primärzellkultur somit am ehesten als potentielle Widerstandserhöhung ohne wesentlichen Verlust der parazellulären proximalen Tubuluseigenschaften zu charakterisieren. Die bessere Expression von Claudin 2 unter Stimulation mit 50 nM Hydrokortison war die Grundlage für den Einsatz dieses Zusatzes in der Primärzellkultur.

### **3.3.1 Eigenschaften der Primärzellkultur**

Die wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben etablierte Primärzellkultur des proximalen Tubulus „mpPTEC“ wurde hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften untersucht. Mit dieser Charakterisierung sollten solide Ausgangswerte für nachfolgende Experimente geschaffen werden. Als wesentliche Eigenschaft des nativen proximalen Tubulus wurde hierzu der transepitheliale Transport von Glucose im Primärzellmodell untersucht. mpPTEC auf acht Filtern wurden über sieben Tage zu einer Gesamtkonfluenz von  $98,86\% \pm 0,05$  kultiviert und anschließend in der Ussing-Kammer gemessen. Nach einer kurzen Adaptationsphase unter Kontrollbedingungen wurden luminal zusätzlich 10 mM Glucose angeboten und die resultierende Veränderung in  $V_{te}$  erfasst. In diesem gepaarten Experiment zeigte sich unter luminaler Applikation von Glucose eine signifikante Positivierung von  $V_{te}$ , welche bei unverändertem  $R_{te}$  in einer signifikanten Änderung des  $I_{sc}$  resultierte (Diagramm 7). Hinweise für einen typischen, natriumgekoppelten Glucose-Transport des proximalen Tubulus mit resultierender luminaler Depolarisation zeigten sich bei fehlender Negativierung von  $V_{te}$  somit nicht.

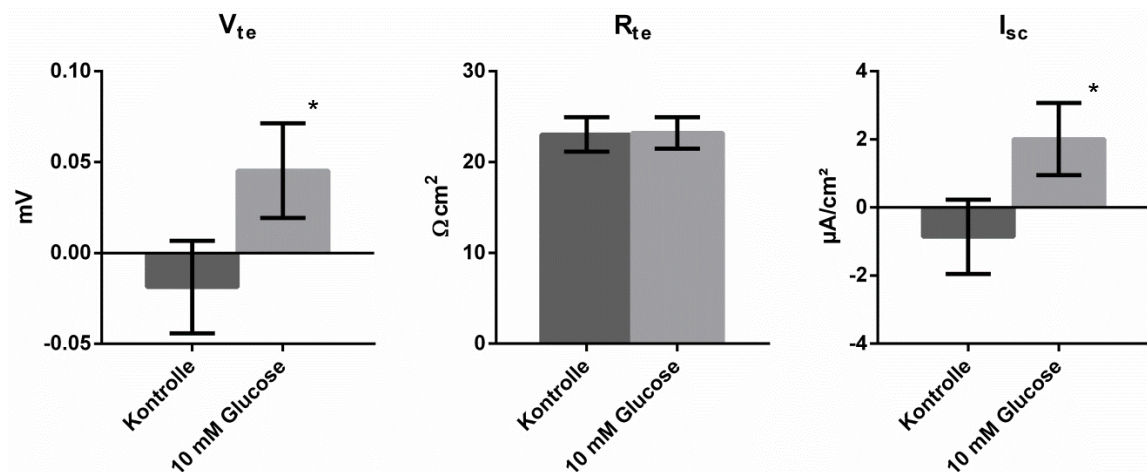
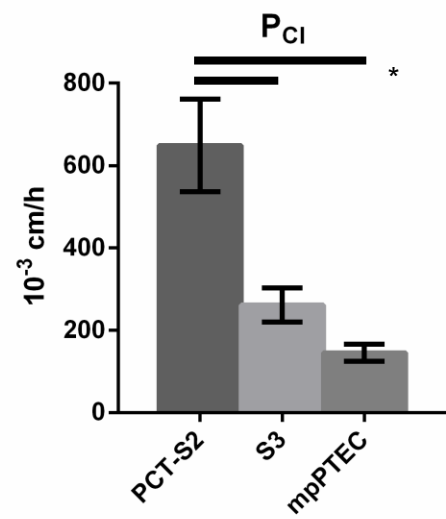
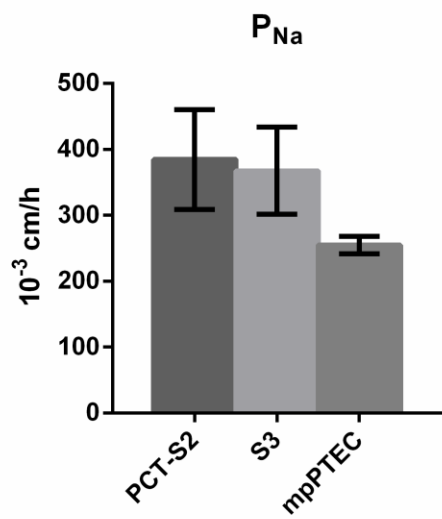
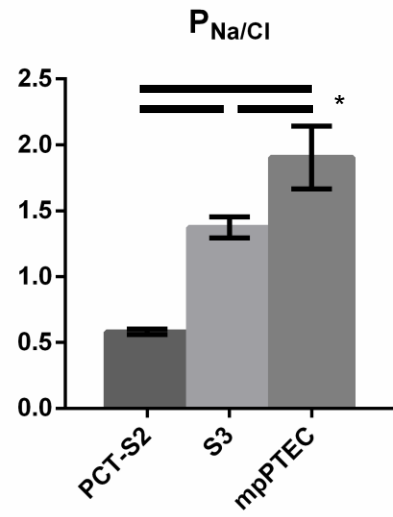
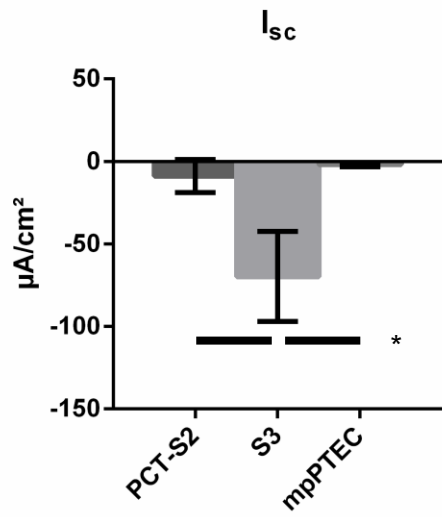
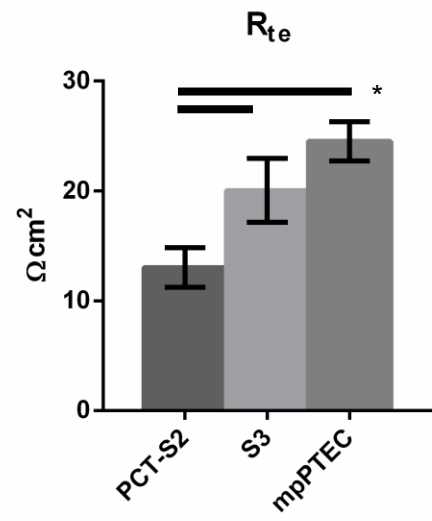
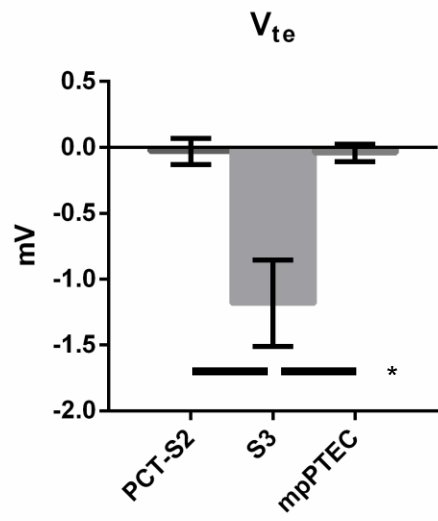


Diagramm 7

Elektrophysiologische Untersuchung zum Nachweis eines elektrogenen, transepithelialen Glucose-Transportes in mpPTEC (n=8).

Neben den transzellulären Eigenschaften wurden zudem die parazellulären Eigenschaften der Primärzellen untersucht. Hierzu wurden mpPTEC auf sechs Transwell Filtereinsätzen über sieben Tage zu einer Gesamtkonfluenz von  $97,96\% \pm 0,03$  kultiviert. Anschließend wurden die Filtereinsätze in der Ussing-Kammer gemessen. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Diagramm 8 vergleichend zum nativen proximalen Tubulus dargestellt. Wie aus dem Diagramm ersichtlich wiesen die mpPTEC kein wesentliches transepitheliales Potential oder  $I_{sc}$  auf. Der  $R_{te}$  zeigte mit  $24,52 \Omega\text{cm}^2 \pm 1,79$  vergleichbare Werte zum nativen S3 Segment ( $20,04 \Omega\text{cm}^2 \pm 2,91$ ), welche sich jedoch signifikant über dem Niveau eines PCT-S2 Segmentes ( $13,02 \Omega\text{cm}^2 \pm 1,81$ ) befanden. Parazellulär zeigte sich im Vergleich zum S3 Segment eine nochmals signifikant erhöhte Kationenselektivität mit einem  $P_{Na/Cl}$  von  $1,9 \pm 0,24$ . Diese war bei vergleichbarer Permeabilität für Natrium Ionen auf eine Reduktion der Permeabilität für Chlorid Ionen im Vergleich mit PCT-S2 Segmenten zurückzuführen. Die Leitfähigkeiten für divalente Kationen zeigten in der untersuchten Stichprobe keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu nativen proximalen Tubuli, auch wenn die Permeabilitäten für Kalzium und Magnesium in den mpPTEC tendenziell reduziert erschienen.



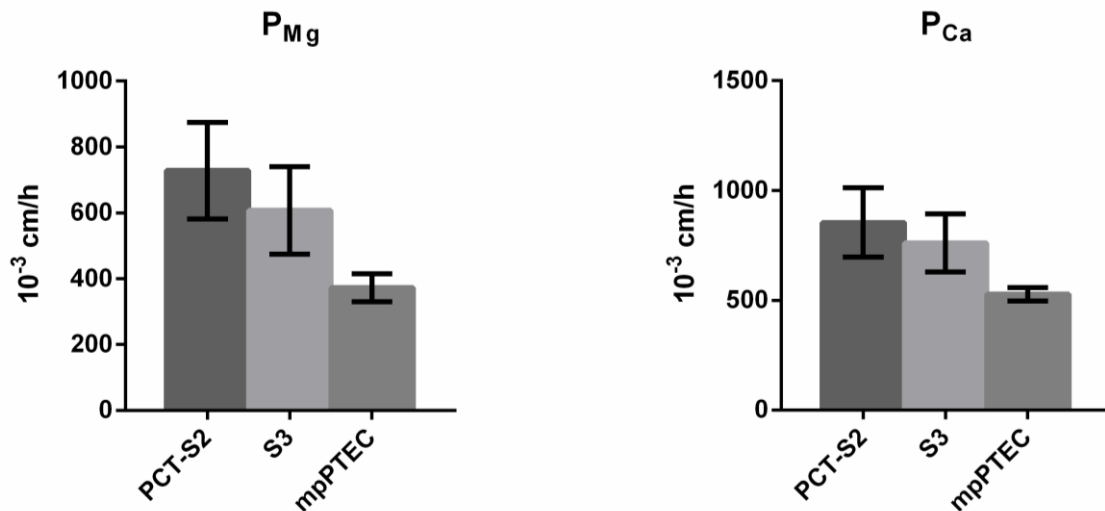


Diagramm 8

Vergleichende graphische Darstellung der elektrophysiologischen Eigenschaften von mpPTEC (n=6) und nativen proximalen Tubulussegmenten (PCT-S2 n=16, S3 n=12).

Neben der elektrophysiologischen Auswertung wurde die mRNA Expression der Claudine 2, 10a, 11, 12, 17 in den mpPTEC untersucht. Mit dieser Analyse sollten potentielle Unterschiede in der Claudin Expression aufgedeckt werden, welche die erhöhte Kationenleitfähigkeit in den mpPTEC erklären könnten. Zudem sollte dieses Experiment die Auswirkungen einer *ex vivo* Kultivierung proximaler Tubuluszellen auf die Claudin Expression objektivieren. mpPTEC wurden für diesen Versuch auf acht Filtern über sieben Tage kultiviert und anschließend mittels RT-PCR untersucht. Aufgrund von deutlich reduziertem Zellmaterial in einer analysierten Probe kamen lediglich sieben mpPTEC (n=7) zur Auswertung. Wie in Diagramm 9 dargestellt zeigte sich für die Claudine 2, 10a und 12 eine signifikante Reduktion der Expression im Vergleich zum jeweiligen Segmentabschnitt des nativen proximalen Tubulus. Besonders deutlich zeigte sich dabei die Reduktion der Claudin 10a Expression. Claudin 11 (n=4, nicht dargestellt) zeigte im Rahmen dieser Analyse eine relative Expression von  $0,02 \pm 0,002$  zum Haushaltsgen Eif3f und war damit erstmalig in proximalen Tubuluszellen nachweisbar. Wie auch im nativen proximalen Tubulus war die Expression von Claudin 17 in mpPTEC sehr gering. Die erhobenen Werte konnten nicht sicher von den Negativkontrollen abgegrenzt werden und wurden daher nicht zur Auswertung herangezogen.

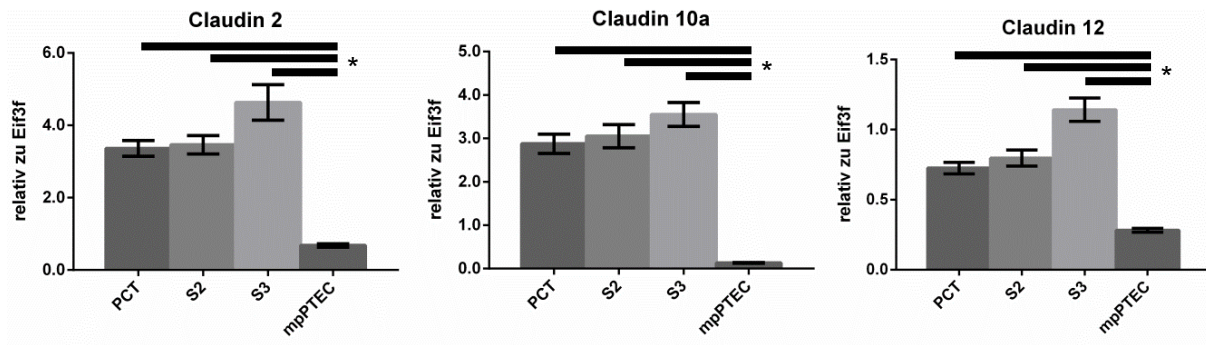


Diagramm 9

Vergleichende graphische Darstellung der Claudin Expression von mpPTEC (n=7) und nativen proximalen Tubulussegmenten (jeweils n=9).

Auch das Expressionsverhältnis der einzelnen Claudine zeigte für die mpPTEC starke Veränderungen im Vergleich zum nativen proximalen Tubulus. Wie in Diagramm 10 dargestellt war das Claudin 2 zu Claudin 10a Verhältnis in den mpPTEC signifikant erhöht. Das Claudin 10a zu Claudin 12 sowie das Claudin 2 zu Claudin 12 Verhältnis waren hingegen signifikant erniedrigt.

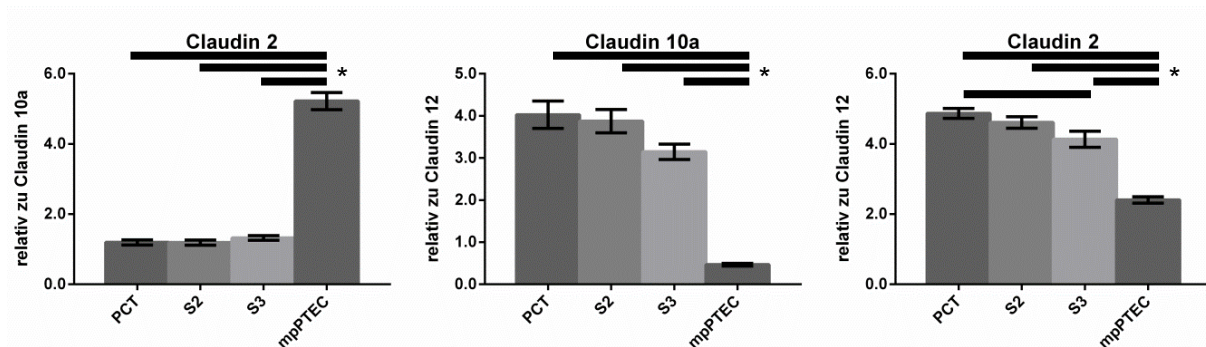


Diagramm 10

Graphische Darstellung der Expressionsverhältnisse einzelner Claudine in mpPTEC (n=7) und Segmenten des nativen proximalen Tubulus (jeweils n=9)

Zu den Expressionsanalysen wurden für alle angelegten Primärzellkulturen Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. In diesen Färbungen sollte die Expression und Lokalisation von Claudin 2 und Claudin 10 in den mpPTEC näher untersucht werden. Die Immunfluoreszenzfärbung für Claudin 2 war dabei in den mpPTEC sehr unbeständig. In einigen Filtern zeigte sich ein junktionales Claudin 2 Signal wie in Abbildung 24. Dieses Signal war jedoch sehr schwach und niemals über den ganzen Filter zu beobachten. In vielen Filtern hingegen zeigte sich jedoch kein junktionales Claudin 2 Signal, sodass eine Auswertung hinsichtlich Lokalisation und Intensität

nicht sinnvoll durchgeführt werden konnte. Für Claudin 10 erfolgte eine Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen an 3 Filtern mit mpPTEC. Es zeigte sich hierbei kein spezifisches junctionales Signal, sodass auf Basis der geringen Expression auf weitere Färbungen verzichtet wurde.

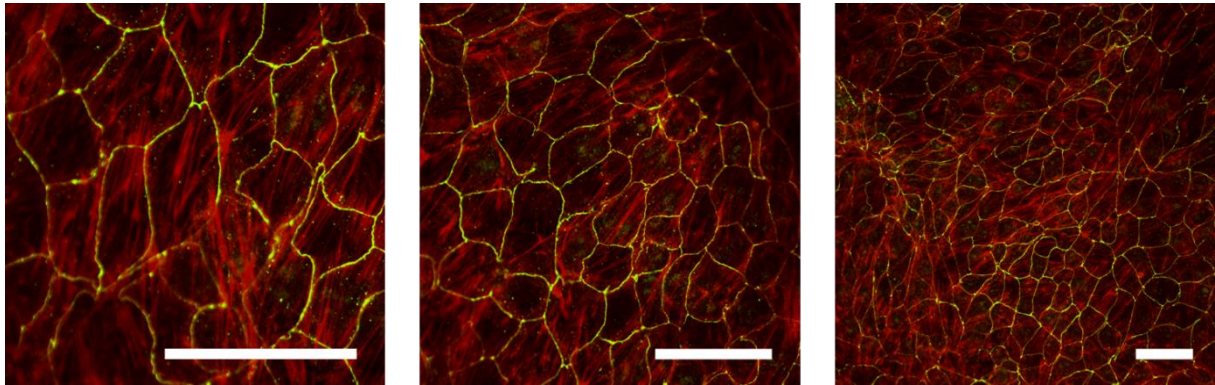
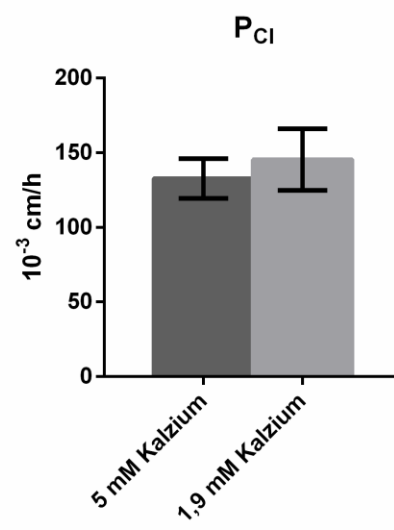
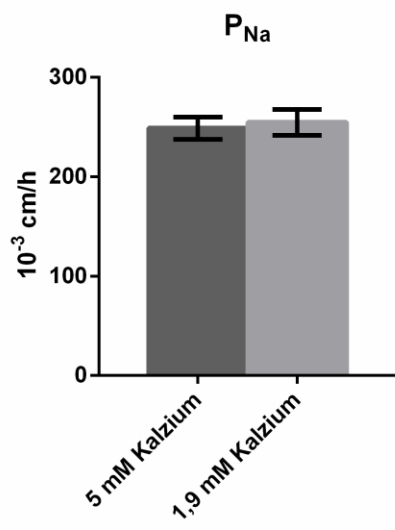
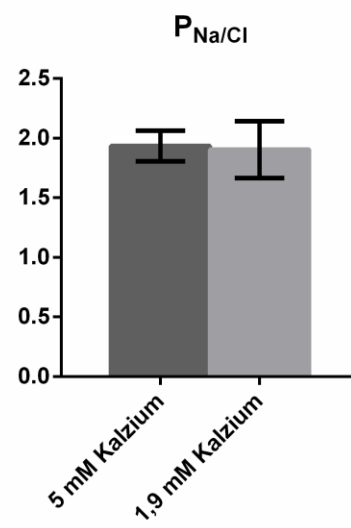
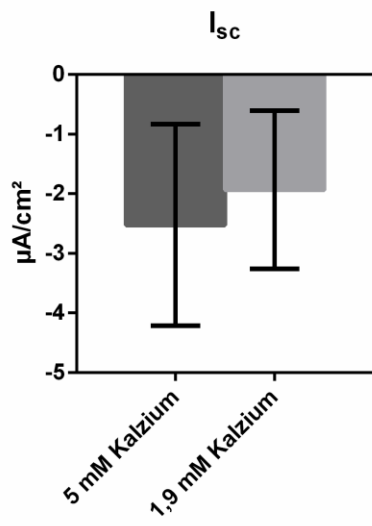
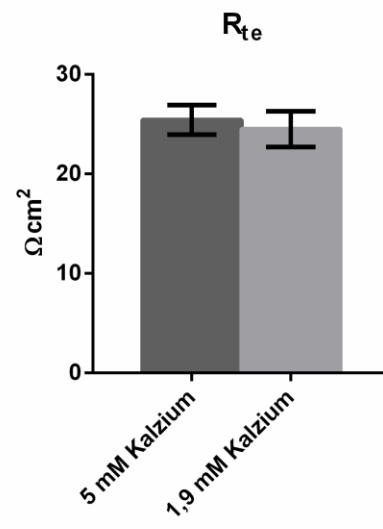
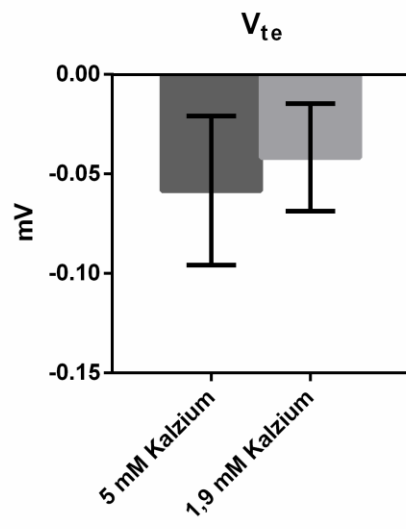


Abbildung 24  
Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin 2 (grün) sowie des Aktin-Zytoskeletts durch Phalloidin (rot) in mpPTEC.  
Maßstabsbalken entsprechen 50 µm.

### 3.3.2 Einfluss einer erhöhten Kalziumkonzentration auf die Eigenschaften der Primärzellkultur

Die direkten Auswirkungen einer erhöhten extrazellulären Kalziumkonzentration auf die parazellulären Eigenschaften proximaler Tubuluszellen sollten ohne adaptive Vorgänge des Gesamtorganismus an mpPTEC untersucht werden. Hierzu wurden jeweils sechs Transwell Filtereinsätze mit mpPTEC unter normaler (Kalziumkonzentration: 1,9 mM) sowie erhöhter extrazellulärer Kalziumkonzentration (Kalziumkonzentration: 5 mM) über acht Tage kultiviert. Beide Versuchsgruppen erreichten eine vergleichbare Konfluenz ( $97,96\% \pm 0,03$  unter 1,9 mM Kalzium;  $98,2\% \pm 0,01$  unter 5 mM Kalzium) unter den Versuchsbedingungen. Um potentielle Unterschiede in den parazellulären Eigenschaften beider Versuchsgruppen detektieren zu können, wurden die Filtereinsätze in der Ussing-Kammer elektrophysiologisch analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind vergleichend in Diagramm 11 dargestellt. Hinsichtlich  $V_{te}$ ,  $R_{te}$ ,  $I_{sc}$  und Permeabilitäten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Versuchsgruppen.





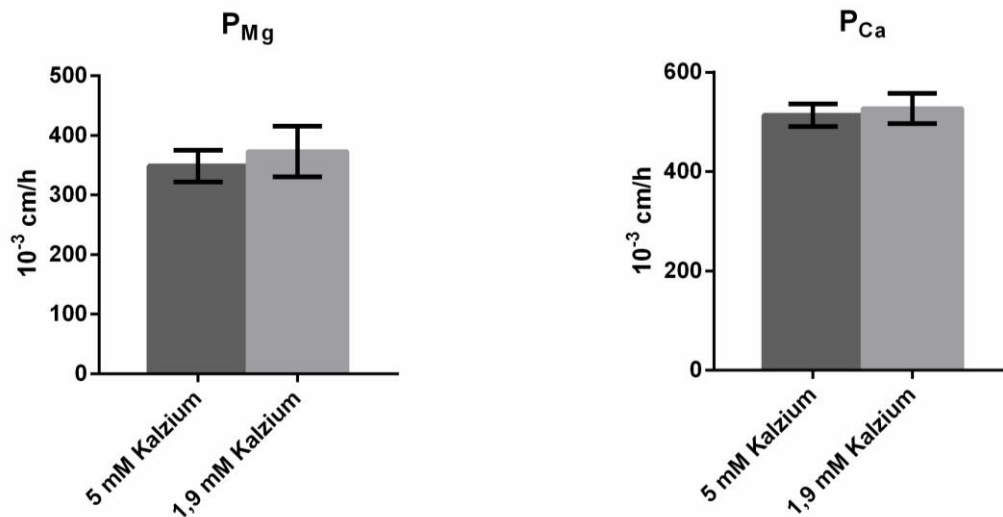


Diagramm 11

Vergleichende graphische Darstellung der elektrophysiologischen Eigenschaften von mpPTEC nach Kultivierung in 1,9 mM sowie 5 mM kalziumhaltigem Medium. (n=6)

Zusätzlich zur elektrophysiologischen Evaluation in der Ussing-Kammer wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin 2 für die unterschiedlichen Versuchsgruppen angefertigt (Abbildung 25).

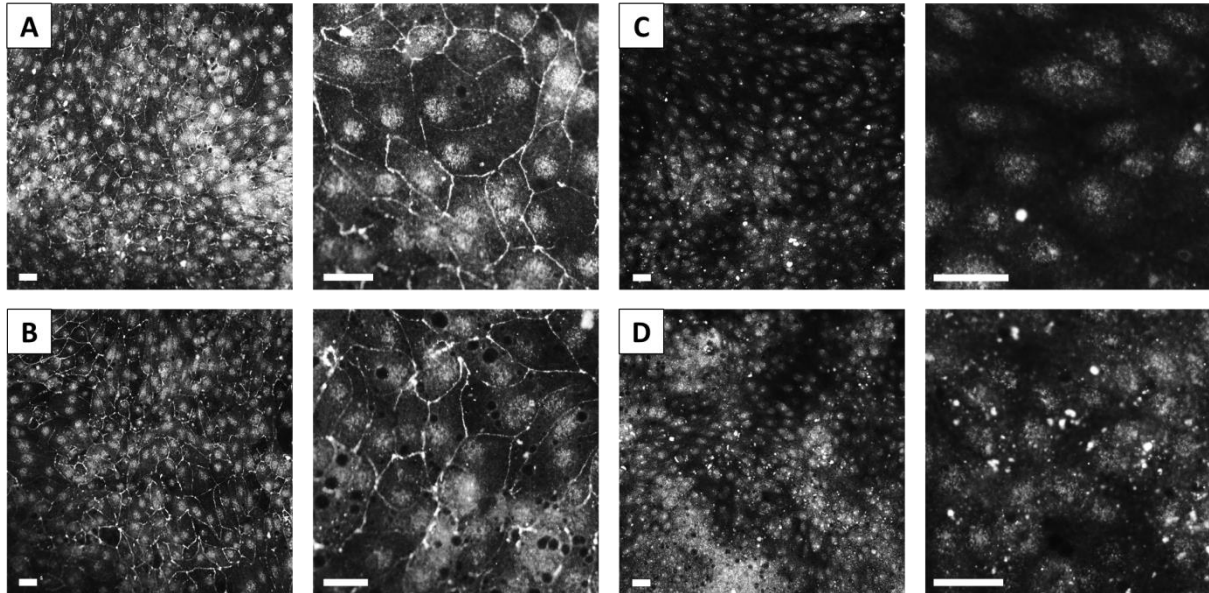


Abbildung 25

Vergleichende Darstellung der Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin 2 in mpPTEC.

- A. Bestes junctionales Signal unter 5 mM extrazellulärer Kalziumkonzentration.
  - B. Bestes junctionales Signal unter 1,9 mM extrazellulärer Kalziumkonzentration.
  - C. Filter ohne junctionales Signal unter 5 mM extrazellulärer Kalziumkonzentration.
  - D. Filter ohne junctionales Signal unter 1,9 mM extrazellulärer Kalziumkonzentration.
- Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu\text{m}$ .

Die unterschiedlichen Filtereinsätze zeigten hierbei wiederum ein sehr unbeständiges Färbeverhalten. Ein junctionales Claudin 2 Signal war unter Ausschöpfung der methodischen Möglichkeiten in beiden Versuchsgruppen lediglich in vier von sechs Filtern nachzuweisen. Dieses Signal war im Rahmen der Detektionsgrenzen nur sehr schwach und diskontinuierlich in den einzelnen Filtern sichtbar. Eine vergleichende Auswertung bezüglich der Intensität und Lokalisierung war daher in den Versuchsgruppen nicht möglich.

### **3.3.3 Effekt von Co-Kultivierung auf die Primärzellkultur**

In einer weiteren Versuchsreihe wurden orientierend die Auswirkungen einer Co-Kultivierung von mpPTEC mit einer basolateralen renalen Mischkultur untersucht. Dieser Versuchsansatz bietet die Möglichkeit die Niere als Gesamtorgan *ex vivo* untersuchen und gezielt manipulieren zu können. Interaktionen zwischen unterschiedlichen renalen Zellen könnten mit diesem Zellmodell abgebildet werden. Gerade für den proximalen Tubulus ist diese Interaktion von besonderer Bedeutung, da durch die immense Kalziumresorption im Interstitium große Mengen freier Kalzium Ionen anfallen können. Damit es nicht zur Überschreitung des Löslichkeitsproduktes der Kalzium Ionen im Interstitium und somit zur Nephrokalzinose kommt, müssen regulative Vorgänge entweder die Kalziumresorption oder die Pufferkapazität des Interstitiums steuern. Für diesen Versuchsansatz wurden mpPTEC auf 12 Filtereinsätzen mit basolateraler Co-Kultur kultiviert. Als Vergleichsgruppe wurden mpPTEC ohne basolaterale Mischkultur generiert. Beide Versuchsgruppen wurden über sieben Tage unter identischen Bedingungen ohne Zusatz von Kortikosteroiden kultiviert. Die mpPTEC mit Co-Kultur erreichten mit  $98,79\% \pm 0,04$  dabei eine vergleichbare Konfluenz zu den isoliert gewachsenen mpPTEC mit  $99,09\% \pm 0,02$ . Die Messung des transepithelialen Widerstandes unter Kulturbedingungen zeigte wie in Diagramm 12 ersichtlich signifikant erhöhte Werte für mpPTEC mit Co-Kultur.

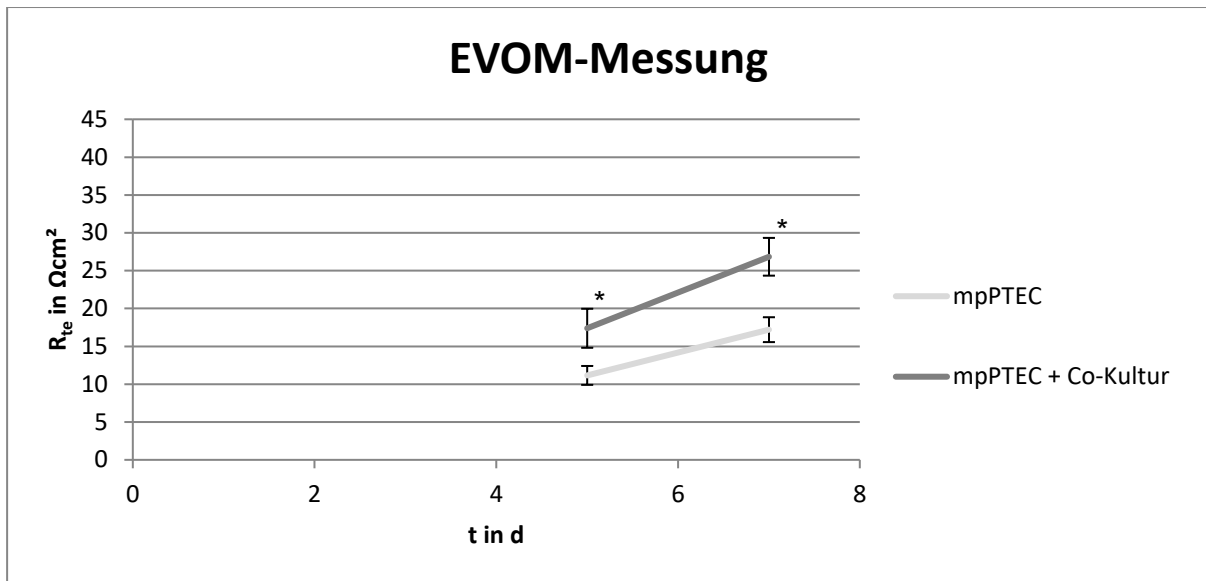


Diagramm 12

Messung des transepithelialen Widerstandes unter Kulturbedingungen mittels EVOM in isoliert kultivierten mpPTEC (n=12) und mpPTEC mit renaler Mischkultur (n=12).

Ussing-Kammer Messungen beider Versuchsgruppen am siebten Kultivierungstag konnten die erhöhten transepithelialen Widerstände in den mpPTEC mit Co-Kultur ( $26,25 \Omega\text{cm}^2 \pm 2,12$ ) im Vergleich zu isoliert kultivierten mpPTEC ( $20,28 \Omega\text{cm}^2 \pm 1,9$ ) nicht bestätigen. In diesem Untersuchungsverfahren zeigte sich jedoch erneut eine deutliche Tendenz, welche das Signifikanzniveau nicht ganz erreichte ( $p=0,056$ ). Die Evaluation eines transepithelialen Glucose-Transportes zeigte in mpPTEC mit Co-Kultur (Diagramm 13) hinsichtlich  $V_{te}$  und  $I_{sc}$  vergleichbare Werte zu isoliert kultivierten mpPTEC (Diagramm 7). Bei fehlender luminaler Depolarisation war somit kein elektrogener Glucose-Transport nachweisbar. Während der Messungen zeigte sich ein spontaner Abfall des transepithelialen Widerstandes über die Zeit. Die Reduktion des transepithelialen Widerstandes war dabei lediglich von geringem Ausmaß und führte im Verlauf zu einer Stabilisierung auf reduziertem Niveau.

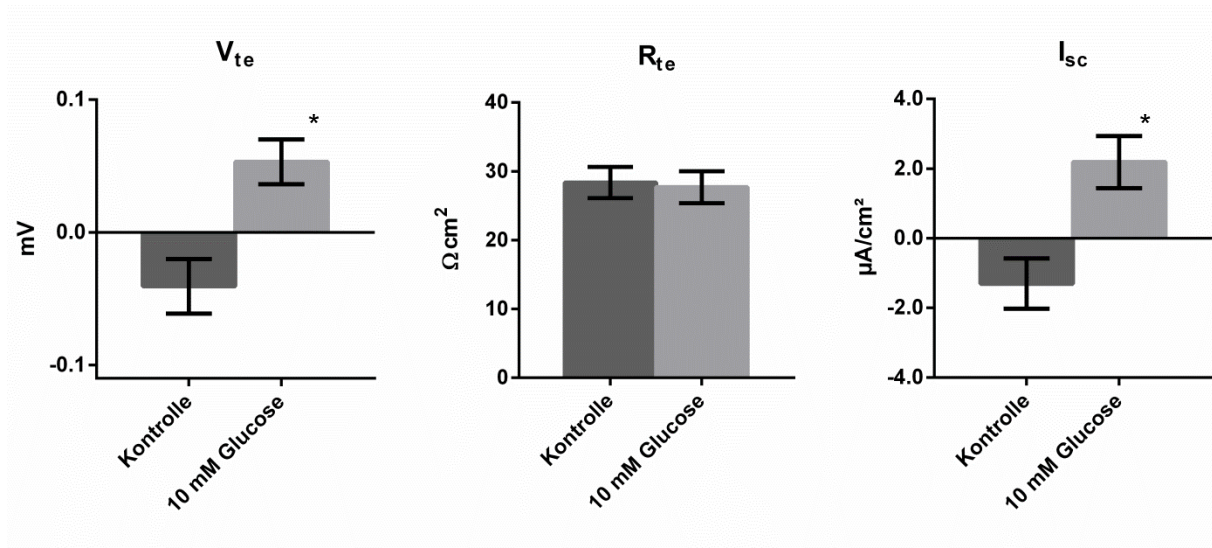
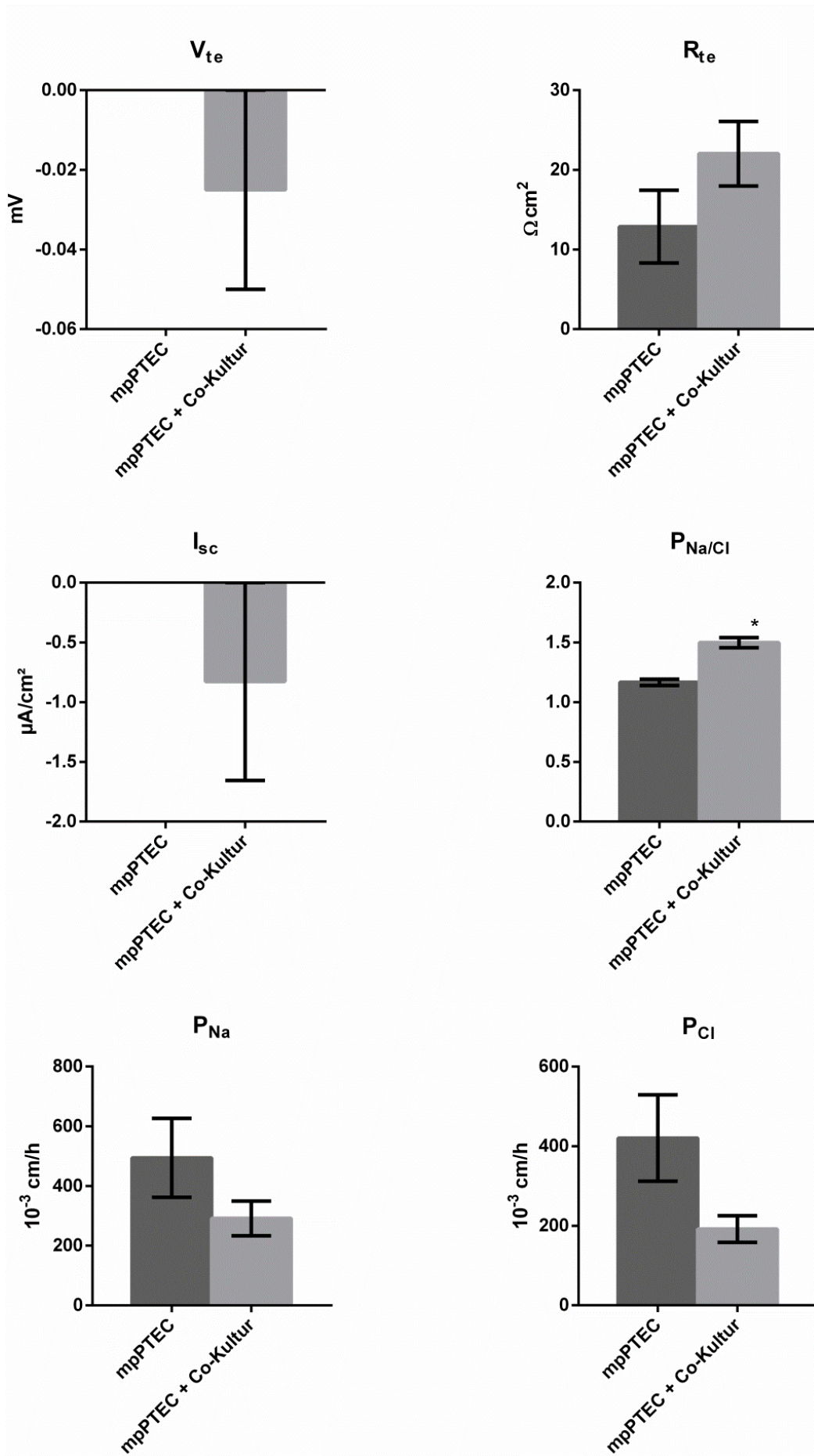


Diagramm 13

Elektrophysiologische Evaluation eines elektrogenen transepithelialen Glucose-Transportes in mpPTEC mit basolateraler renaler Mischkultur (n=8) unter Nutzung der Ussing-Kammer.

Zusätzlich zum transepithelialen Glucose-Transport wurden die mpPTEC mit Co-Kultur orientierend hinsichtlich der parazellulären Eigenschaften untersucht. Hierzu wurden die Filter (mpPTEC n=3; mpPTEC mit Co-Kultur n=4) analog zu 2.2.3.2 in der Ussing-Kammer analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Diagramm 14 dargestellt. Zusammenfassend zeigte sich eine signifikante Steigerung der Kationenselektivität unter basolateraler Co-Kultivierung von mpPTEC. Ursächlich zeigte sich am ehesten eine Reduktion der Permeabilität für Chlorid Ionen, welche aufgrund des Umfangs der Stichprobe jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte. Zudem zeigte sich in dieser Versuchsserie eine allgemeine Reduktion von  $R_{te}$  und  $P_{Na/Cl}$ . Beide Parameter erreichten selbst in isoliert kultivierten mpPTEC nicht das Niveau vorheriger Versuchsreihen (siehe vergleichend Diagramm 8 und 11). Hinsichtlich des transepithelialen Widerstandes zeigte sich in der elektrophysiologischen Messung eine Tendenz zur Steigerung unter Co-Kultivierung von mpPTEC. Vergleichend mit anderen Versuchsreihen erreichten co-kultivierte mpPTEC jedoch nur ein bekanntes Niveau für  $R_{te}$ . Die Permeabilitäten für Kalzium und Magnesium Ionen zeigten sich in mpPTEC unter Co-Kultivierung verringert. Beide Parameter erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau. Insgesamt muss bei den Ergebnissen dieser Analyse berücksichtigt werden, dass es sich lediglich um ein Vorserienexperiment mit kleiner Stichprobe und limitierter Aussagekraft handelt.



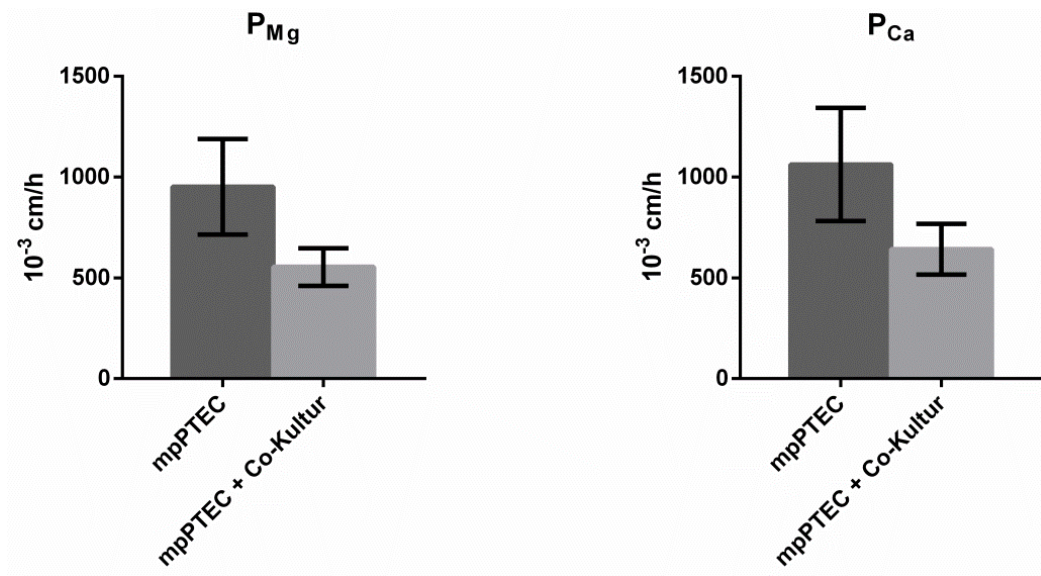


Diagramm 14

Vergleichende graphische Darstellung der orientierenden elektrophysiologischen Analyse von isoliert kultivierten mpPTEC (n=3) zu mpPTEC mit Co-Kultur (n=4).

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodik

#### 4.1.1 Versuchstiere

In den einzelnen Experimenten wurden C57BL/6J Mäuse mit identischem genetischen Hintergrund verwendet. Für die isolierte Perfusion wurden gemischtgeschlechtliche Tiere im Alter von maximal acht Wochen verwendet. Die Festlegung des Alters auf diesen begrenzten Zeitraum erleichterte die mechanische Dissektion einzelner Tubulussegmente. Die Präparation der Zellkultur erfolgte hingegen unter Einsatz eines enzymatischen Verdaus. Dies ermöglichte die Verwendung deutlich älterer gemischtgeschlechtlicher Tiere (bis zu 14 Wochen). Im Diätversuch wurden lediglich weibliche Tiere im Alter von 42 Tagen eingesetzt. Insgesamt führt dies zu einer Heterogenität des Alters und des Geschlechts in der Versuchstierauswahl. Schlussfolgerungen mit Beachtung mehrerer Ergebnisse dieser Arbeit können somit nur vor dem Hintergrund dieser Störfaktoren getroffen werden. Im direkten Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen eines Experiments sind diese Störgrößen jedoch vernachlässigbar klein.

#### 4.1.2 Elektrophysiologische Analysen mittels isolierter Perfusion oder Ussing-Kammer

##### 4.1.2.1 *Tubulusperfusion*

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie die Vitalität der untersuchten Tubulusfragmente in der isolierten Perfusion hängen entscheidend von der Qualifikation des Untersuchers ab. Aus diesem Grund wurde dieser Teil der Arbeit in Kooperation mit Dr. Nina Himmerkus durchgeführt. Bei dem verwendeten Protokoll wurde aus methodischen Gründen auf ein Abdichten des untersuchten Tubulusfragmentes mit Sylgard-Öl verzichtet. Eine Beeinflussung der erhobenen Messwerte durch Leck-Ströme ist somit nicht sicher auszuschließen. Bereits publizierte Daten isoliert perfundierter proximaler Tubuli zeigen jedoch vergleichbare Werte hinsichtlich des transepithelialen Widerstandes (etwa 13 - 20  $\Omega\text{cm}^2$ ) [18, 58, 59]. Eine wichtige Störgröße bei der Erhebung von Diffusionspotentialen sind transepitheliale Transportvorgänge. Die Unterbindung der Transportmechanismen des proximalen Tubulus stellt gerade auf Basis der großen Vielfalt eine



Herausforderung dar [60, 61]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf den Einsatz spezifischer pharmakologischer Inhibitoren verzichtet. Eine Hemmung transepithelialer Transportvorgänge erfolgte stattdessen durch ein vermindertes luminales Substratangebot mit Verzicht auf Glucose oder Hydrogencarbonat. Als einziges bekanntes Substrat verblieb lediglich Phosphat in einer Konzentration von 2 mM in der luminalen Perfusionslösung. Vergleichbare Arbeiten zur Messung der parazellulären Permeabilität des proximalen Tubulus über Diffusionspotentiale nutzten ein weniger restriktives Vorgehen [18, 58]. In den Perfusionslösungen dieser Arbeiten wurden zusätzlich zu Phosphat auch Glucose, Hydrogencarbonat sowie die Aminosäure Alanin als luminalen Substrate eingesetzt. Eine symmetrische Bestimmung von Diffusionspotentialen, mit sequentiell luminalen und basolateralen Lösungswechsel, könnte den Einfluss transzellulärer Transportvorgänge abhängig vom angebotenen Substrat veranschaulichen. Ein Wechsel der luminalen Perfusionslösung konnte jedoch unter den angegebenen Experimentalbedingungen nur zu Lasten der Zellvitalität präparierter Tubulussegmente durchgeführt werden. Zudem zeigten sich auf Basis eines veränderten Perfusionsdruckes Artefakte in der elektrophysiologischen Messung, sodass gänzlich auf einen luminalen Lösungswechsel verzichtet wurde. Insgesamt ist eine Einflussnahme transienter transzellulärer Transportvorgänge auf die bestimmten Diffusionspotentiale somit nicht sicher auszuschließen. Zur Minimierung dieses Effektes wurde daher ein definierter Messzeitpunkt zur Bestimmung der Diffusionspotentiale festgelegt. Die Basis des kurzen zeitlichen Abstandes zwischen Applikation der Experimentallösung (50 Sekunden) und Messung des eingestellten Gleichgewichtspotentials war die Annahme, dass es sich bei den zu messenden Diffusionspotentialen um elektrophysikalische Phänomene handelt, welche sich nach Erreichen des Lösungswechsels instantan ausbilden. Transzelluläre Transportvorgänge gewinnen hingegen erst im weiteren Verlauf aufgrund der sich initial ändernden Konzentrationsgradienten und zellulärer Gegenregulationen an Relevanz. Die morphologischen Auswirkungen einer basolateralen Perfusion mit der Experimentallösung #61 differierten je nach Ursprung der untersuchten Tubulussegmente stark. PCT und S2 Segmente begannen unter basolateraler Perfusion mit der isoosmolaren Lösung #61 deutlich mehr zu schrumpfen als S3 Segmente. Dies könnte auf die stärkere Expression von Natrium gekoppelten Hydrogencarbonat-Symportern im frühen proximalen Tubulus zurückzuführen sein.



[62]. Bei einer niedrigen extrazellulären Natriumkonzentration ist der elektrochemische Gradient für Natrium Ionen über die basolaterale Membran deutlich reduziert, was zu einem vermehrten Ausstrom von Natrium- und Hydrogencarbonat Ionen aus der Zelle führt. Dieser Verlust von Osmolyten aus der Zelle könnte das stärkere Schrumpfen von PCT und S2 Segmenten erklären. Die Auswirkungen dieses Schrumpfungsprozesses auf die parazellulären Eigenschaften eines Epithels und die erhobenen Diffusionspotentiale sind bisher nicht ausreichend dokumentiert. Ein Einfluss auf die erhobenen Messwerte kann daher nicht mit hinreichender Sicherheit ausgeschlossen werden. Die erhobenen elektrophysiologischen Daten wurden retrospektiv zusätzlich einer qualitativen Analyse unterzogen. Hierzu erfolgte eine mikroskopische Auswertung hinsichtlich Vitalität, Länge und Morphologie des untersuchten Tubulus. Als Hauptkriterien für die Vitalität eines untersuchten Tubulussegmentes galten ein klares Zellbild sowie die Präsenz von Mikrovilli. S3 Segmente zeigten hinsichtlich der Vitalität eine starke Abhängigkeit von der Untersuchungsdauer. Bereits 60 Minuten nach Präparation des Versuchstieres zeigte sich mikroskopisch eine Transparenzminderung des Zytoplasmas mit begleitender Zellschwellung als Indikator eines einsetzenden Zelltodes. In PCT sowie S2 Segmenten konnten analoge Veränderungen erst im Intervall von über 120 Minuten nach Präparation des Versuchstieres beobachtet werden. Unter Kenntnis dieser zeitlichen Abhängigkeit erfolgte die Tubulusperfusion in sequentieller Abfolge mit initialer Analytik von S3 Segmenten.

#### **4.1.2.2 Zellkultur und Ussing-Kammer**

Die Messungen in der Ussing-Kammer erfolgten an kultivierten mpPTEC auf Transwell Filtereinsätzen. Die Anwendung eines Einsatzes mit tragender Filtermembran bot die Möglichkeit epitheliale Zellverbände in ihrer polaren Ausrichtung zu analysieren. Der artifizielle Ersatz der Basalmembran *in vivo* durch eine Filtermembran *in vitro* ist dabei jedoch mit einigen Risiken verbunden. So ist die Versorgung des epithelialen Zellverbundes durch Diffusion auf der basolateralen Seite lediglich durch einzelne Poren mit definiertem Durchmesser und Länge möglich. Zudem muss eine Adhärenz der Epithelzellen auf der artifiziellen Basalmembran aus Polyester sichergestellt werden. In einigen Vorarbeiten erfolgte daher eine Beschichtung der Filtermembranen mit Kollagen [63, 64]. Jegliche Beschichtung der Filtermembranen führt jedoch zu einer weiteren Einschränkung der

basolateralen Diffusion durch Okklusion einzelner Filterporen. Die Polarisierung kultivierter Zellen mit Ausbildung von Schlussleisten und Interzellularkontakten könnte auf diese Weise gestört werden. Das Vorgehen bei dieser experimentellen Arbeit erfolgte auf Basis bereits publizierter Daten zur Kultivierung von primären proximalen Tubuluszellen auf Filtermembranen [45]. In den durchgeführten Studien zeigten sich elektronenmikroskopisch weiterhin ausgebildete Schlussleisten sowie kurze Mikrovilli. Lediglich diffus verteilte intrazelluläre Mitochondrien deuteten auf eine diskrete polare Reorganisation mit Änderung der Zytoarchitektur hin. Rein funktionell zeigte sich in Vorarbeiten ein erhaltener elektrogener Glucose-Transport sowie eine endozytotische Aktivität des Epithelverbandes, sodass die Relevanz dieser polaren Reorganisation aktuell von geringem Ausmaß erscheint. Für die Messung der elektrophysiologischen Eigenschaften eines Epithels ist das Erreichen eines konfluenten Wachstums von entscheidender Bedeutung. Zellfreie Bereiche auf den bewachsenen Filtern führen zur Ausbildung von relevanten Kurzschlussströmen und in schweren Fällen zur gänzlichen Aufhebung der parazellulären Selektivität. Zur Sicherstellung eines konfluenten Zellwachstums erfolgte neben der Messung des transepithelialen Widerstandes unter Kulturbedingungen zudem eine Analyse der bewachsenen Filtermembranen mittels Fluoreszenzfärbung des Aktin-Zytoskeletts. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde hierzu Phalloidin eingesetzt. Der Vorteil einer mikroskopischen Konfluenzanalyse gegenüber publizierten Verfahren mittels Bestimmung der Durchlässigkeit von Fluoresceinisothiocyanat [65] liegt in der genaueren örtlichen Zuordnung von Epitheldefekten. Aussparungen im Epithelverbund auf Basis von Präparationsartefakten (Abbildung 26) konnten so von einer zu geringen Epithelzellzahl oder einem Zelltod differenziert werden. Als absolutes Ausschlusskriterium galt ein epithelialer Bewuchs von weniger als 90% der Fläche einer präparierten Filtermembran. Zudem wurden epithelialisierte Filtermembranen mit einem transepithelialen Widerstand von weniger als  $10 \Omega\text{cm}^2$  nach siebentägiger Kultivierung von weiteren Analysen ausgeschlossen. Besonders für die elektrophysiologische Messung der mpPTEC in der modifizierten Ussing-Kammer spielte erneut die Kultivierung auf Transwell Filtereinsätzen eine entscheidende Rolle. Auf Basis des artifiziellen Ersatzes der Basalmembran durch eine Polyestermembran kann lediglich die ungehinderte Diffusion des luminalen Perfusates auf die Zellsicht gewährleistet werden. Das basolaterale Perfusat muss hingegen zuerst die  $0,4 \mu\text{m}$  großen Poren des Filters überwinden um in Kontakt mit

den mpPTEC zu geraten. Durch das kleinere Volumen des luminalen Kompartimentes der Ussing-Kammer zeigte sich in den Versuchsansätzen zudem eine deutlich bessere Durchmischung mit schnellerem Auswaschen bei Applikation luminaler Experimentallösungen. Basolaterale Lösungswechsel unterliegen in diesem System somit einigen konstruktionsbedingten Messungenauigkeiten. Die Experimente dieser Arbeit wurden daher präferentiell mit luminalem Wechsel der Perfusionslösung durchgeführt. Basolaterale Lösungswechsel im Anschluss an das Experiment dienten lediglich dem Ausschluss eines interferierenden transzellulären Transportes bei der Bestimmung von Diffusionspotentialen. Zelltrümmer und andere Verunreinigungen können ebenfalls die elektrophysiologischen Eigenschaften eines Epithels verfälschen oder die Zugänglichkeit von Lösungen zur Zellschicht beeinflussen. Die Messungen von  $V_{te}$  und  $R_{te}$  erfolgten daher erst nach einer initialen Anpassungsphase des Filters, in der durch bilaterale Perfusion Zelltrümmer und andere Verunreinigungen vom Filter entfernt wurden.

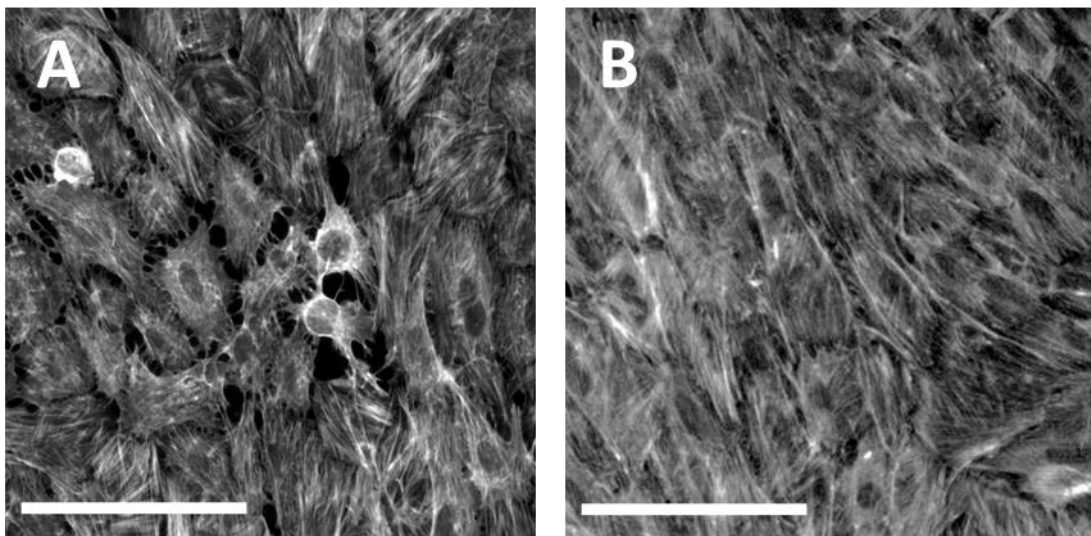


Abbildung 26

Exemplarische mikroskopische Darstellung von interzellulären Kontakten bei der Kultivierung von mpPTEC

In der Fluoreszenzfärbung des Aktin-Zytoskeletts mittels Phalloidin zeigten sich in einigen kultivierten mpPTEC lediglich partiell ausgebildete Zell-Zell-Kontakte (Vergleich zwischen A und B). Die entstandenen Interzellularspalten können in elektrophysiologischen Messungen zu erhöhten Kurzschlussströmen führen und nur inadäquat in Konfluenzmessungen quantifiziert werden. Inwieweit es sich bei diesen fingerförmigen Zell-Zell-Kontakten um Präparationsartefakte handelt ist unklar. Morphologisch zeigte sich dieses Phänomen bei insgesamt reduzierter Zelldichte auf der untersuchten Filtermembran.

Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 100  $\mu\text{m}$ .

Für die Messung des transepithelialen, elektrogenen Glucose-Transportes in der Ussing-Kammer wurden die Lösungen #97 und #97a eingesetzt. Zwischen den Lösungen bestand ein osmotischer Gradient von 10 mOsmol. Dieser osmotische Gradient kann bei asymmetrischer Perfusion der epithelialen Zellschicht zu parazellulären Wasserverschiebungen führen, welche über „solvent drag“ und Ausbildung von Diffusionspotentialen mit den erhobenen transepithelialen Spannungen interferieren. Das Ausmaß dieser Interferenz ist dabei wesentlich von den parazellulären Eigenschaften eines Epithels abhängig. Während es in Epithelien mit parazellulärer Präferenz für Anionen ( $P_{Na/Cl} < 1$ ) über Ausbildung von Diffusionspotentialen zu einer Überschätzung des elektrogenen, transepithelialen Glucose-Transportes kommt, führen Diffusionspotentiale von Epithelien mit parazellulärer Präferenz von Kationen ( $P_{Na/Cl} > 1$ ) zu einer Reduktion erhobener transepithelialer Spannungen. Dies kann folglich zu einer Unterschätzung des elektrogenen, transepithelialen Glucose-Transportes führen.

#### **4.1.3 Expressionsanalysen**

Die Analyse der Expression von spezifischen Genen erfolgte in nativen proximalen Tubuli sowie kultivierten proximalen Tubuluszellen. Die Detektion von mRNA mittels RT-PCR Technik zeichnet sich dabei durch eine exzellente Sensitivität aus. Da selbst geringste Mengen an mRNA durch bindende Primer stark amplifiziert werden können, ist dieses System jedoch auch anfällig für Verunreinigungen. Gerade die starke Expression von Claudin 2 im dünnen absteigenden Teil der Henle-Schleife (siehe Abbildung 21 D) könnte so über verbleibende Tubulusfragmente an selektierten S3 Segmenten proximaler Tubuli die Messergebnisse beeinflussen. Zudem machen die geringen Volumina bei den einzelnen Versuchsansätzen das System empfindlich gegenüber Pipettierfehlern [66]. Diese Ungenauigkeiten konnten in dieser Arbeit durch die Verwendung des internen Kalibrator-Farbstoffes ROX und Dreifachbestimmungen weitestgehend ausgeschlossen werden. Die geringere Spezifität der RT-PCR Reaktion ist auf den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zurückzuführen, welcher lediglich unselektiv an doppelsträngige DNA bindet. Diese unselektive Bindung kann bei Amplifikation von Nebenprodukten einer PCR Reaktion zu falsch erhöhten Intensitäten führen. In dieser Arbeit wurden daher Negativkontrollen und Produktanalysen mittels Schmelzkurve und Gelelektrophorese zum Ausschluss einer solchen Interferenz durchgeführt. Die Anwendung der  $2^{-\Delta Cq}$

Methode zur Auswertung der Daten ist wie unter 2.2.4.4.2 und 2.2.4.4.3 beschrieben nur bei vergleichbaren Effizienzen der unterschiedlichen PCR Reaktionen mathematisch legitim. Zur Evaluation dieses Sachverhaltes wurden Effizienzanalysen aller untersuchten Primerpaare durchgeführt. In den detektierbaren cDNA-Sequenzen variierten die Effizienzen dabei um weniger als 10%. Eine unproportionale Amplifikation der untersuchten Nukleotidsequenzen war somit ausgeschlossen.

Zur Analyse der Genexpression auf Proteinebene wurde die Technik des Western Blots in semiquantitativem Ansatz durchgeführt. Die eingesetzte Proteinmenge war mit circa 30 proximalen Tubulussegmenten in einem niedrigen Bereich. Durch die Isolation definierter Tubulussegmente war das Untersuchungsmaterial aber keiner weiteren Verdünnung unterworfen. Somit konnte der Signal-Rausch-Abstand im Vergleich zu Gesamtnieren- oder Nierenrinden-Präparationen deutlich verbessert werden. Neben der alleinigen Bestimmung der Proteinmenge sind mit dem Western Blot auch regulative Vorgänge zu erfassen. So können je nach Lage des Epitops eines verwendeten Antikörpers auch Phosphorylierungen oder proteolytische Spaltungen des untersuchten Proteins detektiert werden [67].

Zur Analyse der Lokalisation von Claudin 2 und einem potentiellen Membran-„Trafficking“ wurde in dieser Arbeit die Technik der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt. Dieses Verfahren profitiert von einer hohen Selektivität der verwendeten Antikörper. Zudem ist die Präparation des Ausgangsmaterials in den Punkten Fixierung und Schnittführung von besonderer Bedeutung. Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen hinsichtlich Intensität und Lokalisation untersuchter Proteine erfolgte unter identischen experimentellen Bedingungen (Belichtungszeit und Belichtungsintensität). Für Fluoreszenzsignale mit einem Emissionsmaximum nahe 460 nm führt zudem die Autofluoreszenz des proximalen Tubulus durch den hohen Gehalt an reduziertem Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) zu einem intrazellulären Störsignal [68]. Der für die Fluoreszenzfärbung von Claudin 2 verwendete Sekundärantikörper (Emissionsmaximum: 488 nm) musste daher vor einem gewissen Hintergrundsignal betrachtet werden. Im direkten Vergleich mit einem alternativen Sekundärantikörper (Emissionsmaximum: 633 nm) lieferte dieser Antikörper jedoch ein Signal höherer Intensität.

## 4.2 Eigenschaften des parazellulären Weges des proximalen Tubulus

### 4.2.1 Parazelluläre Eigenschaften des nativen proximalen Tubulus

In dieser Arbeit wurden die segmentspezifischen parazellulären Eigenschaften des proximalen Tubulus bestimmt. Entlang des Nephrons zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Widerstandes und der relativen Permeabilität für Natrium gegenüber Chlorid ( $P_{Na/Cl}$ ). Die erhobenen Daten der Widerstandsmessungen im PCT-S2 Segment zeigten sich dabei vergleichbar mit bereits publizierten Messungen aus diesem Segmentabschnitt [18]. Widerstandsmessung im S3 Segment von PT sind in der Literatur bisher nicht erfolgt und entziehen sich daher einer objektiven Überprüfung.  $P_{Na/Cl}$  des proximalen Tubulus wurde bereits in unterschiedlichen Arbeiten untersucht [11, 18, 58, 69-71]. In diesen Arbeiten wurden jedoch explizit einzelne Segmentabschnitte analysiert, sodass zum aktuellen Zeitpunkt keine vergleichbaren Studien mit Evaluation des gesamten proximalen Tubulus existieren. Komplizierend erfolgte in publizierten Studien zudem eine sehr heterogene Bezeichnung der untersuchten Segmentabschnitte, sodass ein direkter Vergleich mit erhobenen Daten dieser Arbeit nicht immer möglich war (siehe Tabelle 12).

Arbeitsgruppe	Organismus	Relative Permeabilität von Natrium zu Chlorid					
		S2	S3	<i>kortikal</i>		<i>juxtamedullär</i>	
				PCT	PST	PCT	PST
Klietz A	Maus	0,58 ± 0,02	1,37 ± 0,08	0,58 ± 0,02			
Muto S	Maus	1,1 ± 0,02					
Abuazza G	Maus			0,89 ± 0,08		0,89 ± 0,08	
Kawamura S	Kaninchen				0,45		0,77
Jacobson HR	Kaninchen			1,56 bis 0,31		2,04	
Berry CA	Kaninchen			1,24 ± 0,1		2,92 ± 0,37	
Quigley R	Kaninchen				ca. 0,5		

Tabelle 12

Vergleich der elektrophysiologisch erhobenen  $P_{Na/Cl}$  mit publizierten Daten anderer Studien [11, 18, 58, 69-71].

Ein Vergleich der aktuellen Daten zur relativen Permeabilität ( $P_{Na/Cl}$ ) von murinen PCT-S2 Segmenten mit bereits publizierten Studien zeigte hierbei ein besonders überraschendes Ergebnis.  $P_{Na/Cl}$  in unseren Messungen zeigte sich auf dem Niveau Claudin 2 defizienter Versuchstiere [18]. Mittels Immunfluoreszenz und Expressionsanalysen konnte jedoch eine deutliche Expression von Claudin 2 in PCT und S2 Segmenten nachgewiesen werden. Die ermittelte Claudin 2 mRNA-Menge

lag dabei sogar deutlich über dem Niveau von anderen Claudinen des proximalen Tubulus. Als potentielle Ursache für diesen Sachverhalt käme eine Analyse unterschiedlicher Abschnitte von einzelnen proximalen Tubulussegmenten in Betracht. In Arbeiten mit sequenzieller Analyse von PCT Segmenten zeigten sich bereits signifikante Unterschiede von  $P_{Na/Cl}$  bei einem Messpunkt Abstand von nur einem Millimeter [71]. Die Daten dieser Arbeit präsentierten sich jedoch ausgesprochen homogen, sodass Unterschiede in  $P_{Na/Cl}$  entlang der perfundierten Segmente sehr unwahrscheinlich erscheinen. Als weiterer wichtiger Datenpunkt dieser Arbeit zeigte sich in der sequentiellen Analyse des proximalen Tubulus ein Anstieg von  $P_{Na/Cl}$ . Während sich in PCT-S2 Segmenten eine deutliche Präferenz der parazellulären Permeabilität ( $P_{Na/Cl} = 0,58 \pm 0,02$ ) für Chlorid Ionen zeigte, kam es im weiteren Verlauf des PT unter Reduktion der Permeabilität für Chlorid Ionen zu einem Anstieg des transepithelialen Widerstandes. In S3 Segmenten zeigte der parazelluläre Weg so eine Präferenz für Natrium Ionen ( $P_{Na/Cl} = 1,37 \pm 0,08$ ). Eine vergleichende Betrachtung mit publizierten Daten isoliert perfundierter PST zeigte in diesem Segmentabschnitt bisher deutlich niedrigere relative Permeabilitäten [58, 69] (siehe Tabelle 12). Welche Rolle die Verwendung unterschiedlicher Versuchstierarten hinsichtlich dieser disparaten Datenpunkte spielte, konnte aufgrund eines Mangels an entsprechenden Publikationen nicht nachvollzogen werden. Unter gemeinsamer Betrachtung der strukturellen sowie funktionellen Daten dieser Arbeit scheint eine Zunahme der relativen Permeabilität des PT in einer sequentiellen Analyse jedoch konklusiv. So zeigte sich im Verlauf des PT eine Steigerung der Claudin 2 und 12 mRNA Expression mit Verschiebung der Claudin 2/12 Ratio zu Claudin 12. Die segmentale Steigerung der Claudin 2 Expression im PT konnte zudem in Immunfluoreszenzanalysen auch auf Proteinebene nachvollzogen werden. Die deutliche Zunahme der Intensität spricht hierbei für eine Zunahme der Proteinmenge an Claudin 2. Claudin 2 sowie Claudin 12 tragen nach der Literatur potentiell zur parazellulären Kationen-Leitfähigkeit bei [13-16, 18]. Wie bereits dargestellt war die Änderung der relativen Permeabilität jedoch vor allem auf eine Reduktion der Permeabilität für Chlorid Ionen zurückzuführen. Die parazelluläre Permeabilität des PT für Natrium Ionen war erstaunlicherweise nicht verändert. Da die Expression von Claudinen mit Anionenpräferenz [20, 25] (Claudin 10a, 17) auf mRNA-Ebene entlang des PT keine signifikanten Änderungen zeigte, ist die Reduktion der Chloridpermeabilität am ehesten durch Interaktionen der exprimierten

Claudine untereinander zu erklären. Dabei ist aktuell unklar inwieweit die einzelnen Claudine des PT in cis- oder trans-Interaktionen treten können und welche funktionellen Konsequenzen sich daraus für den PT ergeben. Alternativ wäre ebenfalls eine post-transkriptionale Regulation über microRNAs [37] mit Reduktion der Proteinmenge an Claudin 10a oder 17 denkbar. Unter Beachtung der Daten dieser Arbeit sowie der aktuell vertretenen Lehrbuchliteratur [72] ist somit eine funktionelle Differenzierung des PT notwendig. Die initialen Segmente des PT zeichnen sich hierbei durch einen hohen transzellulären Transport aus. Als wesentliche Triebkraft der transzellulären Transportvorgänge dient das Ruhemembranpotential, welches über die vorwiegend basolaterale Expression der Natrium-Kalium-ATPase und  $K^+$ -Rezirkulation über entsprechende Kaliumkanäle bereitgestellt wird. Sekundär aktive Transportprozesse können so unter Ausnutzung des elektrochemischen Gradienten von Natrium Ionen eine Resorption von luminalen Substraten auch gegen bestehende Konzentrationsgradienten ermöglichen. Die Depolarisation der luminalen Membran über elektrogenen Transport von Glucose und Aminosäuren führt schließlich zur Ausbildung eines lumennegativen transepithelialen Potentials von bis zu -2 mV. Die deutlich gesteigerte parazelluläre Permeabilität für Chlorid Ionen in PCT-S2 Segmenten kann unter Ausnutzung des transepithelialen Potentials somit eine parazelluläre Resorption von Chlorid Ionen (entlang des elektrochemischen Gradienten) fördern und die Rückdiffusion von Natrium Ionen nach luminal reduzieren. Trotz erhöhter Permeabilität der Schlussleisten für Chlorid Ionen kommt es in initialen Segmenten des PT jedoch zu keinem gänzlichen Ausgleich der luminalen und basolateralen Chloridkonzentration. Die Ursache dieses Sachverhaltes ist aktuell unklar und bedarf weiterer Klärung. Eine Möglichkeit wäre ein Überwiegen der aktiven transzellulären Resorption von Natrium Ionen zusammen mit Hydrogencarbonat bei der lediglich geringen parazellulären Triebkraft für Chlorid Ionen. Die luminal Chloridkonzentration steigt somit im weiteren Verlauf des PT bis auf 135 mM an [61]. Der späte PT zeichnet sich nach fast vollständiger Resorption von Hydrogencarbonat, Aminosäuren und Glucose durch ein geringeres luminales Substratangebot aus. Das transepitheliale Potential wird nicht länger durch elektrogene, luminale Transportprozesse, sondern durch das etablierte Diffusionspotential der Chlorid Ionen bestimmt. Das theoretisch maximale Diffusionspotential von circa +7 mV [61] wird jedoch nicht erreicht. Eine mögliche Ursache dafür zeigt die aktuelle Arbeit im Nachweis einer reduzierten



Permeabilität für Chlorid Ionen in S3 Segmenten durch vermehrte Expression von Claudin 2 und 12.

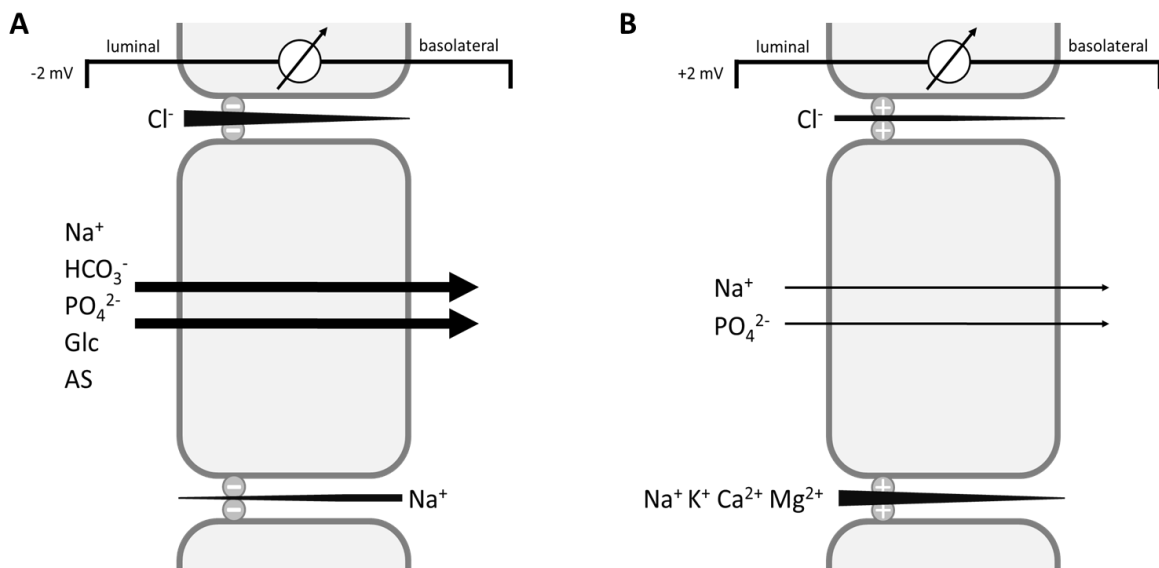


Abbildung 27

Konzeptionelle Darstellung des parazellulären Transportes entlang des proximalen Tubulus.

A. Früher proximaler Tubulus:

Natrium gekoppelte Symporter und Antiporter führen zu einer transzellulären Resorption von Natrium, Hydrogencarbonat, Glucose, Phosphat und Aminosäuren und generieren so ein lumennegatives transepitheliales Potential. Die parazelluläre Barriere ist präferentiell permeabel für Anionen und führt so zu einer parazellulären Resorption von Chlorid Ionen entlang des transepithelialen Potentials. Eine Rückdiffusion von Natrium Ionen ins Tubuluslumen findet unter diesen parazellulären Eigenschaften nur in geringem Ausmaß statt.

B. Später proximaler Tubulus:

Auf Basis eines sich erschöpfenden luminalen Substratangebotes wird der transepitheliale Transport im späten proximalen Tubulus im Wesentlichen vom lumenpositiven Chlorid Diffusionspotential getragen. Bei erhöhter parazellulärer Permeabilität für Natrium Ionen erfolgt so eine weitere parazelluläre Resorption von Kationen entlang des transepithelialen Potentials. Bei fehlenden Hinweisen transzellulärer Transportvorgänge divalenter Kationen im proximalen Tubulus scheint dies zudem der Hauptmechanismus zur Resorption von Kalzium und Magnesium Ionen zu sein.

Eine weitere Möglichkeit für die Diskrepanz der erhobenen Daten zur bestehenden Literatur könnte die Perfusion unterschiedlich gelegener Nephrone sein. Einige Arbeiten zeigten starke Unterschiede in den parazellulären Permeabilitäten von superfiziellen und juxtamedullären Nephrone [69, 71]. Da die distalen S3 Segmente in dieser Arbeit ausschließlich aus Markstrahlen und aus der Rinden-Mark-Grenze stammten, gehören sie zu juxtamedullären Nephrone. Die vorwiegend kortikal präparierten PCT und S2 Segmente wären folglich superfiziell gelegenen Nephrone zuzuordnen. Die Perfusion einiger S1 Segmente zeigte jedoch keine initial erhöhte  $P_{\text{Na/Cl}}$ , wie dies bei superfiziellen PCT in diesen Analysen [71] der Fall war. Die Möglichkeit zweier funktionell unterschiedlicher Nephrone lässt sich mit dieser Arbeit

nicht ausschließen und bedarf näherer Evaluation. Als weiteren wichtigen Unterschied zwischen PCT-S2 und S3 Segmenten fand sich neben den parazellulären Eigenschaften ein deutlich erhöhter Kurzschlussstrom in S3 Segmenten unter Experimentalbedingungen. Während in PCT-S2 Segmenten ohne luminales Angebot von Glucose, Hydrogencarbonat und Aminosäuren kein relevanter  $I_{sc}$  messbar war, zeigten S3 Segmente unter gleichen Bedingungen einen relevanten negativen  $I_{sc}$ . Diese Daten weisen auf einen spezifisch im S3 Segment vorhandenen elektrogenen transzellulären Transport hin. Da das luminale Perfusat ein Phosphat gepuffertes System war, könnten Natrium gekoppelte Symporter (NaPilla) ursächlich für den erhöhten  $I_{sc}$  sein. Publiizierte Arbeiten zeigten jedoch eine deutliche Abnahme Natrium gekoppelter Phosphattransporter entlang des proximalen Tubulus [73, 74], sodass andere elektrogene Transporter im S3 Segment eine Rolle spielen müssen. Eine mögliche Erklärung wäre die Expression des epithelialen Natriumkanals (ENaC), welcher bereits in anderen Arbeiten im proximalen Tubulus nachgewiesen werden konnte [75].

#### **4.2.2 Expressionsanalysen im Diätversuch**

Im Diätversuch mit anschließender molekularbiologischer Aufarbeitung isolierter proximaler Tubuli wurde überprüft, ob Claudine des PT *in vivo* an der funktionellen Anpassung beteiligt sind. Unter Betrachtung der metabolischen Daten regulierten die Versuchstiere der Störung durch die Diät entsprechend entgegen. Unter oraler Phosphatbelastung zeigte sich eine physiologische Plasmaphosphatkonzentration bei erhöhter fraktioneller Phosphatexkretion sowie tendenziell reduzierter fraktioneller Kalziumexkretion. Im Diätversuch mit oraler Kalziumrestriktion zeigten sich ähnliche Befunde. Am ehesten war diese Adaptation durch eine vermehrte Stimulation mit PTH zu erklären, welche unter oraler Kalziumrestriktion vor allem auf einer reduzierten Aktivierung des parathyreoidalen CaSR [76] mit konsekutiv gesteigerter PTH-Sekretion beruht. Unter erhöhter oraler Phosphatzufuhr scheint zudem eine verzögerte Degradation der mRNA des Parathormons [77] sowie eine renale Stimulation mit FGF-23 eine Rolle zu spielen. Dies führte bei beiden Versuchsgruppen somit letztlich am ehesten zu einer vermehrten Internalisierung von proximal tubulären Natrium-Phosphat-Kotransportern mit konsekutiv erhöhter Phosphatausscheidung. Unter oraler Kalziumbelastung zeigte sich bei erhöhter Plasmakalziumkonzentration eine kompensatorische Steigerung der renalen

Kalziumexkretion. Zur Prävention einer tubulären Überschreitung des Kalziumphosphat-Produktes fand sich in dieser Versuchsgruppe unter Reduktion der CaSR-abhängigen parathyreoidalen PTH-Sekretion zudem eine signifikant reduzierte renale Phosphatexkretion. Die Hyperkalziurie unter oraler Kalziumbelastung ist unter anderem durch bekannte hormonell induzierte Regulationsmechanismen des distalen Tubulus mit Internalisierung von TRPV5-Kanälen erklärt [78]. Zudem führen lokal erhöhte renale Kalziumspiegel über direkte Stimulation des CaSR mit konsekutiv erhöhter Expression von Claudin 14 zur reduzierten parazellulären Resorption vom Kalzium in der TAL [35]. Anhand der aktuellen Daten dieser Arbeit wurden zudem weitere Regulationsmechanismen im Bereich des PT aufgezeigt. Unter konstanter Expression der proximal tubulären Claudin 2 mRNA zeigte sich eine signifikante Reduktion der Menge an Claudin 2 Protein mit vollständiger Integration in die TJ. Als Ursache der reduzierten Proteinmenge an Claudin 2 wäre somit eine endogene Suppression mittels miRNA denkbar, wie sie bereits im Bereich der TAL etabliert ist. Alternativ besteht zudem die Option einer beschleunigten Proteindegradierung im Proteasom durch Polyubiquitinierung. Ob eine Vermittlung dieser adaptiven Vorgänge mit Änderung der parazellulären Claudinkomposition letztlich über direkte Stimulation eines proximal tubulär exprimierten CaSR [79] oder aber über hormonelle Stimuli erfolgt, bleibt aktuell unklar. Unter Beachtung der beschriebenen Eigenschaften von Claudin 2 als Kationen-präferierende Wasserpore [18] könnte ein verminderter Gehalt dieses Claudins gerade im Bereich von S3 Segmenten unter Applikation eines lumenpositiven transepithelialen Potentials zur deutlichen Einschränkung der parazellulären Resorption von Natrium sowie von divalenten Kationen [16] führen. Funktionell ergäbe sich somit ein weiterer Mechanismus zur Prävention einer Hyperkalziämie oder Nephrokalzinose. Gegen die Annahme einer direkten Modulation der Kalziumresorption über Steigerung oder Senkung der Claudin 2 Expression im Sinne einer parazellulären „Kalziumpore“ sprechen jedoch die Daten der Analytik des nativen PT. Trotz sequentieller Zunahme der Claudin 2 sowie Claudin 12 mRNA Expression entlang des PT zeigte sich in späten S3 Segmenten keine gesteigerte Permeabilität für Kalzium Ionen. Ob eine posttranskriptionale Regulation über miRNAs in diesem Rahmen ebenfalls relevante Einflüsse auf die Claudin 2 Expression entfaltet, ist aktuell unklar und bedarf weiterer Versuchsreihen mit segmentspezifischer Quantifizierung der Claudin 2 Proteinmenge mittels Western Blot. Unter oraler Kalziumbelastung ist somit unter Beachtung aller

Daten vor allem mit einer Verminderung der proximal tubulären Natrium- und Wasserresorption zu rechnen. Der multifaktoriell bedingte Natrium- und Wasserverlust des PT beruht hierbei auf einer Kombination aus quantitativer Reduktion von Claudin 2 mit zudem bestehender hyperkalziurisch inhibierter parazellulärer Resorption von Natrium Ionen [80]. Diese Verdünnung des proximal tubulären Urins könnte einer Überschreitung des Kalziumphosphatproduktes mit Bildung von Kalziumpräzipitaten bereits im PT vorbeugen. Zudem könnten die Kompensationsmechanismen in der TAL mit weiterer Reduktion der transzellulären Natrium- und parazellulären Kalziumresorption [36] eine Aktivierung des tubuloglomerulären Feedbackmechanismus bewirken. Die resultierende Reduktion der glomerulären Filtrationsrate würde damit zusätzlich einer erhöhten Kalziumexposition im PT vorbeugen.

#### **4.3 Die Primärzellkultur als Modell des nativen proximalen Tubulus**

Eine vergleichende Betrachtung der elektrophysiologischen Daten des aktuell etablierten Primärzellmodells mit den Eigenschaften des nativen PT zeigte eine starke Ähnlichkeit der mpPTEC zu nativen spätproximalen S3 Segmenten. mpPTEC weisen bei vergleichbaren transepithelialen Widerständen jedoch eine weitere Steigerung von  $P_{Na/Cl}$  unter deutlicher Reduktion der Permeabilität für Chlorid Ionen auf. Begleitend zeigte sich eine tendenzielle Reduktion der parazellulären Permeabilität für divalente Kationen. Expressionsanalysen zeigten als Ursache dieser Befunde eine generelle Verminderung der Claudin mRNA Expression unter besonderer Beteiligung von Claudin 10a mit Verschiebung des Claudin 2 zu Claudin 10a Verhältnisses. Die ausgeprägte Reduktion der Claudin 10a Expression unter den angegebenen Kulturbedingungen bleibt zunächst unklar, könnte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der parazellulären Anionenpermeabilität [25] beigetragen haben. Ein bekanntes Phänomen von Primärzellkulturen unterschiedlichen Ursprungs ist der partielle Verlust ursprünglich erhaltener Zellfunktionen über die Zeit in Kultur [81]. Dies konnte auch im Zellmodell der mpPTEC beobachtet werden. Neben einer deutlichen Reduktion der Claudin Expression konnte im Vergleich mit anderen Primärzellmodellen in elektrophysiologischen Analysen kein elektrogener Glucose-Transport [45] nachgewiesen werden. Die Entwicklung eines signifikanten lumenpositiven transepithelialen Potentials unter luminaler Applikation von Glucose war bei bestehendem osmotischen Gradienten von 10 mOsmol und Präferenz der

parazellulären Barriere für Kationen somit am ehesten die Folge einer parazellulären Elektrolytverschiebung im Sinne eines Diffusionspotentials. Eine klare Identifizierung des Primärzellursprungs war neben der strikten histomorphologischen Selektion im Rahmen der Tubuluspräparation [82] daher vor allem durch die typische Expression von parazellulären Proteinen wie Claudin 2, Claudin 10a sowie Claudin 12 möglich. Insbesondere der Nachweis von Claudin 2 in der Immunfluoreszenz ist hierbei als Alleinstellungsmerkmal der mpPTEC im Vergleich zu existenten immortalisierten Zelllinien des proximalen Tubulus wie OK, LLC-PK1, NRK-52E und HK-2 anzusehen [39]. Inwieweit die inkonsistente Darstellung von Claudin 2 in der Immunfluoreszenz von mpPTEC als weiteres Zeichen einer vorzeitigen Dedifferenzierung zu werten ist, bleibt bei fehlender Evidenz einer parazellulären Integration von Claudin 2 in anderen Primärzellkulturen proximaler Tubuli zunächst unklar. Die deutliche Reduktion der Claudin Expression in mpPTEC mit Nachweis von Claudin 10 nahe der Detektionsgrenze limitiert zudem die Bewertung regulativer Änderungen der parazellulären Barriere. Die *in vivo* erhobenen Daten einer reduzierten Claudin 2 Expression unter Kalziumbelastung konnten somit *in vitro* auf Basis der Immunfluoreszenz nicht nachvollzogen werden. Auch elektrophysiologisch zeigten sich keine Hinweise auf einen direkten Einfluss einer erhöhten Kalziumkonzentration auf die parazellulären Eigenschaften von mpPTEC. Diese Beobachtungen führten letztlich zu der Hypothese, dass die *in vivo* beobachteten Veränderungen der Claudin 2 Expression unter oraler Kalziumbelastung nicht über eine direkte Stimulation des proximal tubulären CaSR sondern durch hormonelle Einflüsse vermittelt werden. Die Erweiterung des etablierten Zellmodells um ein interstitielles Zellkompartiment konnte in dieser Arbeit durch basolaterale Co-Kultivierung realisiert werden. Bis auf eine geringe Steigerung des transepithelialen Widerstands in EVOM-Messungen zeigten sich keine signifikanten elektrophysiologischen Veränderungen unter Co-Kultivierung der mpPTEC mit einer basolateralen Mischkultur. Die Diskrepanz der Widerstandsmessungen unter Kulturbedingungen mit denen in der modifizierten Ussing-Kammer war hierbei am ehesten auf ein Anhaften von Zellbestandteilen an der basolateralen Fläche der Filtermembran zurückzuführen. Diese Hypothese wird durch den zügigen Abfall des transepithelialen Widerstandes nach dem basolateralen Flüssigkeitswechsel gestützt.

#### **4.4 Ausblick**

Eine wesentliche Erkenntnis aus dieser Arbeit ist die funktionelle Heterogenität des proximalen Tubulus. Diese erfordert weiterführende Studien an definierten Subsegmenten des proximalen Tubulus bezüglich seiner hormonell modulierbaren parazellulären Eigenschaften. Ein erneuter Diätversuch könnte über subsegmentspezifische elektrophysiologische Analytik die funktionellen Auswirkungen einer reduzierten Claudin 2 Expression unter oraler Kalziumbelastung ergründen. Strukturelle Analysen spezifisch isolierter proximaler Tubulus-Subsegmente mittels RT-PCR und Western Blot könnten im Rahmen dieser Versuchsreihe zudem die Sensitivität hinsichtlich geringer Änderungen der Claudin-Expression erhöhen. Die Hypothese einer hormonellen Regulation der parazellulären Claudinkomposition in proximalen Tubulussegmenten bedarf einer weiteren Untersuchung im Zellmodell. Zusätzlich zu etablierten immortalisierten Zelllinien kann hierzu unter Beachtung der Sensitivität auch das mpPTEC Primärzellmodell eingesetzt werden. Neben einer reinen Analyse des parazellulären Claudin 2 Bestandes unter Exposition regulativer Hormone wie Calcitonin, Parathormon, Calcitriol und FGF-23 könnten selbige Studien zudem die Hypothese einer posttranskriptionalen Regulation der Claudin 2 Expression näher ergründen.

## 5. Zusammenfassung

Die Homöostase interstitieller Elektrolytkonzentrationen sichert die Funktion der Einzelzelle im Organismus. Über die Ausscheidung von Elektrolyten und Wasser spielt die Niere eine Schlüsselrolle in diesem Prozess. Bereits im proximalen Tubulus erfolgt die trans- sowie parazelluläre Resorption eines Großteils der glomerulär filtrierten Moleküle. Die Einbeziehung des parazellulären Weges führt hierbei abhängig von der Permeabilität der parazellulären Barriere zu einer Ökonomisierung des transepithelialen Transportes (bis zu 10 Natrium Ionen pro ATP). Die parazellulären Eigenschaften eines Epithels werden durch Integration gewebespezifisch exprimierter Claudine in die Tight junctions bestimmt. Sie spielen somit eine kritische Rolle für die Funktion des proximalen Tubulus im Dienste der Elektrolythomöostase.

Die Daten dieser Arbeit unterstützen die funktionelle Differenzierung des proximalen Tubulus in Subsegmente mit divergenten parazellulären Eigenschaften. In elektrophysiologischen Analysen zeigten initiale PCT-S2 Segmente bei einem transepithelialen Widerstand von  $13,02 \pm 1,81 \Omega\text{cm}^2$  eine ausgeprägte parazelluläre Anionenselektivität ( $P_{\text{Na/Cl}}$  von  $0,58 \pm 0,02$ ). Späte S3-Segmente zeichneten sich bei deutlich erhöhtem transepithelialen Widerstand von  $20,04 \pm 2,91 \Omega\text{cm}^2$  durch eine Reduktion der parazellulären Permeabilität für Chlorid Ionen aus ( $P_{\text{Cl}}$   $648,6 \pm 112,5 \cdot 10^{-3}\text{cm/h}$  zu  $261,5 \pm 41,8 \cdot 10^{-3}\text{cm/h}$ ). Strukturell konnte als Ursache dieser Befunde eine Steigerung der Claudin 2 sowie Claudin 12 Expression in spät proximalen S3 Segmenten gefunden werden, welche zu einer Verschiebung der parazellulären Permeabilität ( $P_{\text{Na/Cl}}$  von  $1,37 \pm 0,08$ ) zu Gunsten von Kationen führte. Elektrophysiologisch zeigten sich in späten S3 Segmenten zudem Hinweise auf einen elektrogenen Elektrolyttransport ( $V_{\text{te}}$  von  $-1,18 \pm 0,33 \text{ mV}$ ). Bei restriktivem luminalen Substratangebot im Rahmen der Versuchsbedingungen stützen diese Daten die Existenz eines luminal exprimierten epithelialen Natriumkanals.

Die Regulation der parazellulären Eigenschaften eines Epithels unter oraler Kalziumbelastung konnten bereits im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife nachgewiesen werden. Diese Arbeit erweitert das bestehende Wissen durch Nachweis einer mRNA unabhängigen, quantitativen Regulation des proximal tubulären Claudin 2 Bestandes. Die junctionale Reduktion von Claudin 2 unter oraler Kalziumbelastung scheint im proximalen Tubulus jedoch funktionell keine direkten

Auswirkungen auf die Kalziumpermeabilität zu entfalten. Vielmehr scheinen diuretische Effekte im Vordergrund zu stehen, welche über tubuloglomeruläre Rückkopplung einer Präzipitation von Kalziumsalzen im Tubulussystem vorbeugen könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Primärzellmodell „mpPTEC“ des proximalen Tubulus auf Basis einer histomorphologischen Selektion etabliert werden. Elektrophysiologisch zeigten sich mpPTEC hinsichtlich des transepithelialen Widerstandes ( $R_{te}$  von  $24,52 \pm 1,79 \Omega\text{cm}^2$ ) vergleichbar zu späten S3 Segmenten des nativen proximalen Tubulus. Analog zu S3 Segmenten zeigten mpPTEC zudem eine Restriktion der parazellulären Anionenpermeabilität ( $P_{Cl}$  von  $145,4 \pm 20,7 \cdot 10^{-3}\text{cm/h}$ ). Im Gegensatz zum nativen proximalen Tubulus schien diese Verschiebung der parazellulären Permeabilität ( $P_{Na/Cl}$  von  $1,9 \pm 0,24$ ) strukturell auf einer Claudin 10 prädominanten Reduktion der Claudin Expression zu beruhen. Claudin 2 zeigte weiterhin eine inhomogene Integration in die Tight junctions. Neben immortalisierten Zelllinien unklaren renalen Ursprungs (MDCK II) stand somit erstmalig ein Zellmodell des späten proximalen Tubulus mit parazellulärem Nachweis von Claudin 2 zur Verfügung. Das Defizit eines transzellulären Glucose-Transportes, als mögliche Folge einer einsetzenden Entdifferenzierung des Primärzellmodells, war unter Beachtung des lediglich geringen Glucose-Transportes spät proximaler Tubulussegmente von untergeordneter Bedeutung.

Die Auswertung parazellulärer Regulationsmechanismen zeigte in mpPTEC keinen direkten Einfluss einer erhöhten interstitiellen oder luminalen Kalziumkonzentration. Die adaptive Reduktion des junctionalen Claudin 2 Bestandes in nativen proximalen Tubuli konnte im Rahmen der Sensitivität des Primärzellmodells nicht nachvollzogen werden. Die Befunde am nativen Tubulus stützen jedoch die Hypothese einer hormonell induzierten Regulation des proximal tubulären Claudin 2 Bestandes und machen weitere Arbeiten unter Einbeziehung von Parathormon, Calcitonin, Calcitriol und FGF-23 erforderlich.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. 2006, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 2. Auflage.
2. Deetjen, P., E.-J. Speckmann, and J. Hescheler, *Physiologie*. 2005, München: Elsevier GmbH; Urban & Fischer Verlag.
3. Gunzel, D. and M. Fromm, *Claudins and other tight junction proteins*. *Compr Physiol*, 2012. **2**(3): p. 1819-52.
4. Van Itallie, C.M. and J.M. Anderson, *Architecture of tight junctions and principles of molecular composition*. *Semin Cell Dev Biol*, 2014. **36**: p. 157-65.
5. Krause, G., et al., *Structure and function of claudins*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(3): p. 631-45.
6. Gunzel, D. and A.S. Yu, *Claudins and the modulation of tight junction permeability*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(2): p. 525-69.
7. Gunzel, D. and A.S. Yu, *Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle*. *Pflugers Arch*, 2009. **458**(1): p. 77-88.
8. Kiuchi-Saishin, Y., et al., *Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(4): p. 875-86.
9. Kuhlmann, U., et al., *Nephrologie*. 2015, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 6. Auflage.
10. Aronson, P.S. and G. Giebisch, *Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(2 Pt 2): p. F179-92.
11. Abuzazza, G., et al., *Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **291**(6): p. F1132-41.
12. Van Itallie, C.M., et al., *The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 3): p. 298-305.
13. Amasheh, S., et al., *Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 24): p. 4969-76.
14. Furuse, M., et al., *Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells*. *J Cell Biol*, 2001. **153**(2): p. 263-72.

15. Van Itallie, C.M., A.S. Fanning, and J.M. Anderson, *Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(6): p. F1078-84.
16. Yu, A.S., et al., *Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site*. J Gen Physiol, 2009. **133**(1): p. 111-27.
17. Rosenthal, R., et al., *Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 11): p. 1913-21.
18. Muto, S., et al., *Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(17): p. 8011-6.
19. Gunzel, D., et al., *Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 10): p. 1507-17.
20. Van Itallie, C.M., et al., *Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(6): p. F1288-99.
21. Morita, K., et al., *Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis*. J Cell Biol, 1999. **145**(3): p. 579-88.
22. Gow, A., et al., *CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice*. Cell, 1999. **99**(6): p. 649-59.
23. Fujita, H., et al., *Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca<sup>2+</sup> absorption between enterocytes*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(5): p. 1912-21.
24. Kuhne, H., et al., *Vitamin D receptor knockout mice exhibit elongated intestinal microvilli and increased ezrin expression*. Nutr Res, 2015.
25. Krug, S.M., et al., *Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(16): p. 2765-78.
26. Müller-Esterl, W., *Biochemie*. 2004, München: Elsevier GmbH. 1. Auflage.
27. Yatabe, M.S., et al., *Effects of a high-sodium diet on renal tubule Ca<sup>2+</sup> transporter and claudin expression in Wistar-Kyoto rats*. BMC Nephrol, 2012. **13**: p. 160.

28. Breiderhoff, T., et al., *Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(35): p. 14241-6.
29. Nagai, S., et al., *Acute down-regulation of sodium-dependent phosphate transporter NPT2a involves predominantly the cAMP/PKA pathway as revealed by signaling-selective parathyroid hormone analogs*. J Biol Chem, 2011. **286**(2): p. 1618-26.
30. Collazo, R., et al., *Acute regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 by parathyroid hormone via NHE3 phosphorylation and dynamin-dependent endocytosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 31601-8.
31. Kondo, T., et al., *1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(9): p. 1411-9.
32. Kitazawa, S., et al., *Vitamin D3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter*. J Cell Biochem, 2003. **89**(4): p. 771-7.
33. Takeda, S., et al., *Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice*. Endocrinology, 1999. **140**(2): p. 1005-8.
34. Hu, M.C., et al., *Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 503-33.
35. Gong, Y., et al., *Claudin-14 regulates renal Ca<sup>(+)</sup>(+) transport in response to CaSR signalling via a novel microRNA pathway*. EMBO J, 2012. **31**(8): p. 1999-2012.
36. Plain, A., et al., *Corticomedullary difference in the effects of dietary Ca on tight junction properties in thick ascending limbs of Henle's loop*. Pflugers Arch, 2015.
37. Ambros, V., *microRNAs: tiny regulators with great potential*. Cell, 2001. **107**(7): p. 823-6.
38. Butterworth, M.B., *Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by membrane trafficking*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(12): p. 1166-77.

39. Prozialeck, W.C., et al., *Epithelial barrier characteristics and expression of cell adhesion molecules in proximal tubule-derived cell lines commonly used for in vitro toxicity studies*. Toxicol In Vitro, 2006. **20**(6): p. 942-53.
40. Tang, M.J., K.R. Suresh, and R.L. Tannen, *Carbohydrate metabolism by primary cultures of rabbit proximal tubules*. Am J Physiol, 1989. **256**(3 Pt 1): p. C532-9.
41. Vinay, P., A. Gougoux, and G. Lemieux, *Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules*. Am J Physiol, 1981. **241**(4): p. F403-11.
42. Gesek, F.A., D.W. Wolff, and J.W. Strandhoy, *Improved separation method for rat proximal and distal renal tubules*. Am J Physiol, 1987. **253**(2 Pt 2): p. F358-65.
43. Kamiyama, M., et al., *The establishment of a primary culture system of proximal tubule segments using specific markers from normal mouse kidneys*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(4): p. 5098-111.
44. Van der Hauwaert, C., et al., *Isolation and characterization of a primary proximal tubular epithelial cell model from human kidney by CD10/CD13 double labeling*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66750.
45. Terryn, S., et al., *A primary culture of mouse proximal tubular cells, established on collagen-coated membranes*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(2): p. F476-85.
46. Rubera, I., et al., *Chloride currents in primary cultures of rabbit proximal and distal convoluted tubules*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 2): p. F651-63.
47. Merot, J., et al., *Patch clamp study on primary culture of isolated proximal convoluted tubules*. Pflugers Arch, 1988. **413**(1): p. 51-61.
48. Greger, R. and W. Hampel, *A modified system for in vitro perfusion of isolated renal tubules*. Pflugers Arch, 1981. **389**(2): p. 175-6.
49. Greger, R., *Cation selectivity of the isolated perfused cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney*. Pflugers Arch, 1981. **390**(1): p. 30-7.
50. Barry, P.H. and J.W. Lynch, *Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis*. J Membr Biol, 1991. **121**(2): p. 101-17.
51. Plain, A., *Regulation of the tight junction permeabilities in the TAL*, in *Department of physiology*. 2015, CAU Kiel: Kiel. p. 120.
52. Kimizuka, H. and K. Koketsu, *Ion transport through cell membrane*. J Theor Biol, 1964. **6**(2): p. 290-305.

53. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
54. Bustin, S.A., et al., *Quantitative real-time RT-PCR--a perspective*. J Mol Endocrinol, 2005. **34**(3): p. 597-601.
55. Kouadjo, K.E., et al., *Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 127.
56. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
57. Hazen-Martin, D.J., et al., *Elevated glucose alters paracellular transport of cultured human proximal tubule cells*. Kidney Int, 1989. **35**(1): p. 31-9.
58. Quigley, R. and M. Baum, *Developmental changes in rabbit proximal straight tubule paracellular permeability*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(3): p. F525-31.
59. You, Y., D.J. Hirsch, and N.S. Morgunov, *Functional integrity of proximal tubule cells: effects of temperature and preservation solutions*. J Am Soc Nephrol, 1993. **3**(12): p. 1900-12.
60. Kokko, J.P., *Proximal tubule potential difference. Dependence on glucose on glucose, HCO<sub>3</sub>, and amino acids*. J Clin Invest, 1973. **52**(6): p. 1362-7.
61. Barratt, L.J., et al., *Factors governing the transepithelial potential difference across the proximal tubule of the rat kidney*. J Clin Invest, 1974. **53**(2): p. 454-64.
62. Kondo, Y. and E. Fromter, *Axial heterogeneity of sodium-bicarbonate cotransport in proximal straight tubule of rabbit kidney*. Pflugers Arch, 1987. **410**(4-5): p. 481-6.
63. Verkoelen, C.F., et al., *Absence of a transcellular oxalate transport mechanism in LLC-PK1 and MDCK cells cultured on porous supports*. Scanning Microsc, 1993. **7**(3): p. 1031-8; discussion 1038-40.
64. Wilson, J.M., N. Fasel, and J.P. Kraehenbuhl, *Polarity of endogenous and exogenous glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins in Madin-Darby canine kidney cells*. J Cell Sci, 1990. **96** ( Pt 1): p. 143-9.
65. Palmoski, M.J., et al., *Characterization of rabbit primary proximal tubule kidney cell cultures grown on Millicell-HA membrane filters*. Toxicol In Vitro, 1992. **6**(6): p. 557-67.

66. Lorenz, T.C., *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies*. J Vis Exp, 2012(63): p. e3998.
67. Van Itallie, C.M., et al., *Phosphorylation of claudin-2 on serine 208 promotes membrane retention and reduces trafficking to lysosomes*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 20): p. 4902-12.
68. Balaban, R.S. and L.J. Mandel, *Metabolic substrate utilization by rabbit proximal tubule. An NADH fluorescence study*. Am J Physiol, 1988. **254**(3 Pt 2): p. F407-16.
69. Kawamura, S., et al., *Characteristics of salt and water transport in superficial and juxtamedullary straight segments of proximal tubules*. J Clin Invest, 1975. **55**(6): p. 1269-77.
70. Berry, C.A. and F.C. Rector, Jr., *Relative sodium-to-chloride permeability in the proximal convoluted tubule*. Am J Physiol, 1978. **235**(6): p. F592-604.
71. Jacobson, H.R. and J.P. Kokko, *Intrinsic differences in various segments of the proximal convoluted tubule*. J Clin Invest, 1976. **57**(4): p. 818-25.
72. Silbernagel, S. and A. Despopoulos, *Taschenatlas Physiologie*. 2012, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 8. Auflage.
73. Custer, M., et al., *Expression of Na-P(i) cotransport in rat kidney: localization by RT-PCR and immunohistochemistry*. Am J Physiol, 1994. **266**(5 Pt 2): p. F767-74.
74. Madjdpour, C., et al., *Segment-specific expression of sodium-phosphate cotransporters NaPi-IIa and -IIc and interacting proteins in mouse renal proximal tubules*. Pflugers Arch, 2004. **448**(4): p. 402-10.
75. Willmann, J.K., et al., *Amiloride-inhibitable Na<sup>+</sup> conductance in rat proximal tubule*. Pflugers Arch, 1997. **434**(2): p. 173-8.
76. Brown, E.M., *Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2013. **27**(3): p. 333-43.
77. Moallem, E., et al., *RNA-Protein binding and post-transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate*. J Biol Chem, 1998. **273**(9): p. 5253-9.
78. den Dekker, E., et al., *The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation*. Cell Calcium, 2003. **33**(5-6): p. 497-507.
79. Riccardi, D., et al., *Localization of the extracellular Ca<sup>2+</sup>/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. F611-22.

80. Yu, A.S., M.H. Cheng, and R.D. Coalson, *Calcium inhibits paracellular sodium conductance through claudin-2 by competitive binding*. J Biol Chem, 2010. **285**(47): p. 37060-9.
81. Koechlin, N., et al., *Conversion of a rabbit proximal convoluted tubule (PCT) into a cell monolayer: ultrastructural study of cell dedifferentiation and redifferentiation*. Eur J Cell Biol, 1991. **54**(2): p. 224-36.
82. Pohl, M., et al., *Intrarenal renin angiotensin system revisited: role of megalin-dependent endocytosis along the proximal nephron*. J Biol Chem, 2010. **285**(53): p. 41935-46.

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 7.1 Abbildungen

<b>Abbildung 1</b>	Struktureller Aufbau eines Claudins	2
<b>Abbildung 2</b>	Segmentspezifische Expression von Claudinen in der Niere	3
<b>Abbildung 3</b>	Schematische Darstellung eines juxtamedullären Nephrons	4
<b>Abbildung 4</b>	Schematische Darstellung des transepithelialen sowie parazellulären Transports im proximalen Tubulus	6
<b>Abbildung 5</b>	Schematische Darstellung von Regulationsmöglichkeiten der Proteinfunktion	12
<b>Abbildung 6</b>	Mikroskopisches Bild isolierter proximaler Tubuli	24
<b>Abbildung 7</b>	Schematische Darstellung des Pipettensystems zur Tubulusperfusion	28
<b>Abbildung 8</b>	Exemplarische Darstellung der Bestimmung von $V_{te}$ und $\Delta V_{te}$ aus den Perfusionsdaten	30
<b>Abbildung 9</b>	Exemplarische Darstellung der Bestimmung von Diffusionspotentialen im Rahmen der Tubulusperfusion	32
<b>Abbildung 10</b>	Originalbild und schematische Darstellung der modifizierten Ussing-Kammer nach Willy van Driessche	34
<b>Abbildung 11</b>	Darstellung eines Ussing-Kammer-Versuches zur Messung eines elektrogener transepithelialen Glucose-Transportes	35
<b>Abbildung 12</b>	Exemplarische Darstellung eines Ussing-Kammer-Versuches zur Bestimmung von Diffusionspotentialen	36
<b>Abbildung 13</b>	Darstellung eines digitalisierten Agarosegels zur Analyse der amplifizierten Produkte im Rahmen der RT-PCR	40
<b>Abbildung 14</b>	Exemplarische Darstellung der Bestimmung des Cycle of quantification (Cq) im Rahmen der RT-PCR	41
<b>Abbildung 15</b>	Exemplarische Darstellung der Effektivitätsbestimmung einer RT-PCR	43
<b>Abbildung 16</b>	Exemplarische Darstellung einer Western Blot-Analyse mit Image J	49
<b>Abbildung 17</b>	Histomorphologie dissezierter Segmentabschnitte des nativen proximalen Tubulus	50



<b>Abbildung 18</b>	Exemplarische Schreiberaufzeichnung der isolierten Tubulusperfusion	51
<b>Abbildung 19</b>	Darstellung der adaptiven Regulation der Claudin 2 Proteinmenge im Rahmen des Diätversuches	59
<b>Abbildung 20</b>	Immunfluoreszenzfärbungen kortikaler sowie medullärer Schnittbilder für Claudin 2 im Diätversuch	61
<b>Abbildung 21</b>	Detailaufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 2 in unterschiedlichen Segmenten des Nephrons	62
<b>Abbildung 22</b>	Mikroskopische Darstellung des Auswachsens isolierter proximaler Tubulussegmente	63
<b>Abbildung 23</b>	Mikroskopische Darstellung der Kultivierung von proximalen Tubulusfragmenten mit ITS X100 und ohne ITS X100	65
<b>Abbildung 24</b>	Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin 2 sowie des Aktin-Zytoskeletts in mpPTEC	72
<b>Abbildung 25</b>	Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von Claudin 2 in mpPTEC je nach Kalziumkonzentration des Kulturmediums	74
<b>Abbildung 26</b>	Exemplarische mikroskopische Darstellung von interzellulären Kontakten bei der Kultivierung von mpPTEC	84
<b>Abbildung 27</b>	Konzeptionelle Darstellung des parazellulären Transportes im Verlauf des proximalen Tubulus	90

## 7.2 Tabellen

<b>Tabelle 1</b>	Hormone und ihre Wirkungen auf den Kalziumhaushalt	10
<b>Tabelle 2</b>	Zusammensetzung des Spezialfutters	15
<b>Tabelle 3</b>	Zusammensetzung des mpPTEC-Kulturmediums	27
<b>Tabelle 4</b>	Übersicht der verwendeten Primer in der RT-PCT	38
<b>Tabelle 5</b>	Temperaturprotokoll der RT-PCT	39
<b>Tabelle 6</b>	Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper	45
<b>Tabelle 7</b>	Übersicht über Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe für die Immunfluoreszenz-Färbung der mpPTEC	46
<b>Tabelle 8</b>	Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Detektion des Zielproteins im Western Blot	47

<b>Tabelle 9</b>	Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Detektion eines konstant exprimierten Proteins im Western Blot	48
<b>Tabelle 10</b>	Plasmakonzentrationen und fraktionelle Exkretionen der diätetisch eingestellten C57BL/6J-Mäuse	56
<b>Tabelle 11</b>	Vergleichende elektrophysiologische Analyse von mpPTEC mit Hydrokortison und mpPTEC ohne Hydrokortison	66
<b>Tabelle 12</b>	Vergleich der elektrophysiologisch erhobenen $P_{Na/Cl}$ mit publizierten Daten anderer Studien	87

### 7.3 Diagramme

<b>Diagramm 1</b>	Zusammenfassende Darstellung der elektrophysiologischen Eigenschaften von PCT-S2 und S3 Segmenten	52
<b>Diagramm 2</b>	Expressionsprofil der Claudin mRNA in einzelnen Segmentabschnitten des proximalen Tubulus	53
<b>Diagramm 3</b>	Expressionsverhältnisse der mRNA einzelner Claudine von Segmenten nativer proximaler Tubuli	55
<b>Diagramm 4</b>	Expressionsanalyse der Claudin 2, 10a und 12 mRNA in proximalen Tubuli nach einwöchiger Diät	57
<b>Diagramm 5</b>	Expressionsverhältnisse der Claudin 2, 10a und 12 mRNA im proximalen Tubulus nach einwöchiger Diät	58
<b>Diagramm 6</b>	Vergleichende Darstellung von $R_{te}$ -Messungen mechanisch und enzymatisch zerkleinerter proximaler Tubulussegmente	64
<b>Diagramm 7</b>	Elektrophysiologische Untersuchung eines elektrogenen, transepithelialen Glucose-Transportes in mpPTEC	68
<b>Diagramm 8</b>	Vergleichende Darstellung der elektrophysiologischen Eigenschaften von mpPTEC und nativen Segmenten des PT	79
<b>Diagramm 9</b>	Vergleichende Darstellung der Claudin Expression von mpPTEC und nativen Segmenten des PT	71
<b>Diagramm 10</b>	Vergleichende Darstellung der Expressionsverhältnisse einzelner Claudine in mpPTEC und Segmenten des PT	71
<b>Diagramm 11</b>	Darstellung der elektrophysiologischen Eigenschaften von mpPTEC je nach Kalziumkonzentration des Kulturmediums	73
<b>Diagramm 12</b>	Messung des $R_{te}$ unter Kulturbedingungen mittels EVOM in mpPTEC und mpPTEC mit renaler Mischkultur	76
<b>Diagramm 13</b>	Evaluation eines elektrogenen transepithelialen Glucose-Transportes in mpPTEC mit basolateraler Mischkultur	77
<b>Diagramm 14</b>	Vergleichende Darstellung der elektrophysiologischen Eigenschaften von mpPTEC und mpPTEC mit Mischkultur	78

## 8. Anhang

### 8.1 Geräte

Daten-Schreiber	BD41 & BD11E, Kipp and Zonen, Delft, NL
Inkubator	B5060 EK-CO2, Heraeus, Hanau, D
Kryostat	CM3050S, Leica, Wetzlar, D
Lasermikroskop	Axiovert 200M + LSM 510 Modul, Zeiss, Jena, D
Lumineszenzdetektor	LAS-3000mini, Fuji Photo Film, Düsseldorf, D
Mikroskop	AX10, Zeiss, Jena, D
Osmometer	Micro-Osmometer, Model 210– Fiske Associates, Norwood, US
pH-Meter	Präzisions pH-Meter, Knick, Berlin, D
Real-Time-Cycler	Applied Biosystems 7500fast, Life Technologies, Carlsbad, US
Stereomikroskop	MZ16, Leica, Wetzlar, D
Sterilbank	Hera Safe, Heraeus, Hanau, D
Thermomixer	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, D
Vortex	MS 3 digital, IKA, Staufen, D
Blotting-Kammer	Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad, München, D
Zentrifugen	Biofuge vito, Heraeus, Hanau, D

### 8.2 Tierversuchsantrag

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

## **Danksagung**

Für die umfassende Betreuung im Rahmen dieser Promotion gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Nina Himmerkus sowie Herrn Prof. Markus Bleich. Auch in Zeiten wissenschaftlicher Regression standen sie mir in ihrer fachlichen Kompetenz zur Seite und unterstützten somit maßgeblich die Fertigstellung dieser Dissertation.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem gesamten Team des Physiologischen Institutes der CAU Kiel sowie insbesondere den Mitarbeitern der AG Bleich für die entgegenkommende, produktive Zusammenarbeit bedanken.

Im Rahmen meiner aktuellen klinischen Tätigkeit gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Kunzendorf, welcher mein Interesse für die experimentelle Forschung durch strukturierte wissenschaftliche Reflexion des täglichen Handelns festigte.

Den Kollegen Frau Dr. Vera Christine Wulfmeyer, Herrn Dr. Bören Görke, Herrn Dr. Jan-Ole Heller sowie Frau Dr. Julia Boldt möchte ich für die motivierenden Gespräche neben der täglichen Routine danken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die finanzielle sowie moralische Unterstützung im Rahmen meines Studiums, ohne die diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gebührt meiner Frau Jana-Christine Kietz für die aufmunternden Worte zur rechten Zeit und das Verständnis so manch investierter knapper Stunde.

## Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Nachname: Kietz  
 Vorname: Adrian  
 Geburtsdatum: 11.04.1986  
 Geburtsort: Demmin

### Schulbildung

1992 – 1996 Grundschule Loitz  
 1996 – 2005 Gymnasium Loitz  
 Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,7

### Zivildienst

2005 – 2006 Innere Medizin, Station II, Kreiskrankenhaus Demmin

### Studium

Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Note: 1,16  
 10/2006 – 11/2012  
 08/2008 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 1,5  
 11/2012 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 1,0

### Famulaturen

2009 Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Demmin  
 Urologische Praxis Bendel & Sanmann, Demmin  
 2010 Urologie, UKSH Campus Kiel  
 Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Demmin

### Praktisches Jahr

1. Tertial Chirurgie, UKSH Campus Kiel  
 2. Tertial Innere Medizin, WKK Heide  
 3. Tertial Allgemeinmedizinische Gemeinschaftspraxis  
 Duncker & Harms, Kiel

### Beruflicher Werdegang

01/2013 – 03/2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Physiologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Leitung: Prof. Dr. med. M. Bleich  
 seit 04/2014 Assistenzarzt an der Klinik für Innere Medizin IV, UKSH Campus Kiel, Leitung: Prof. Dr. med. U. Kunzendorf

## Publikationsliste

### Teilnahme an Tagungen:

18. Ostseephysiologen-Tagung, Greifswald, 2013

93<sup>rd</sup> Annual Meeting – DPG, Mainz, 2014

### Poster und Vorträge:

Klietz A., Himmerkus N., Bleich M.

Calcium handling of the proximal tubule

Treffen Kieler Nephrologen-Physiologen, Kiel, 2013, Vortrag

Klietz A., Himmerkus N., Grüssel S., Wulfmeyer V. C., Bleich M.

Paracellular pathway properties of primary cultured in comparison to freshly isolated proximal tubules

93<sup>rd</sup> Annual Meeting – DPG, Mainz, 2014, Poster

Milatz S., Brinkhus M., Klietz A., Wulfmeyer V. C., Merkel C., Bleich M.,  
Himmerkus N.

Expression and function of claudins in the renal proximal tubule

96<sup>th</sup> Annual Meeting – DPG, Greifswald, 2017, Poster

Brinkhus M., Himmerkus N., Klietz A., Wulfmeyer V. C., Bleich M., Milatz S.

The Functional Diversity of Claudins in the Renal Proximal Tubule

9<sup>th</sup> Annual Meeting – DGFN, Mannheim, 2017, Poster

### Originalarbeit:

Plain A., Wulfmeyer V. C., Milatz S., Klietz A., Hou J., Bleich M., Himmerkus N.

Corticomedullary difference in the effects of dietary  $\text{Ca}^{2+}$  on tight junction properties in thick ascending limbs of Henle's loop.

Pflugers Arch. 2016 Feb; 468(2):293-303