

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

Die Rolle von Claudin-4 in der parazellulären Chloridresorption im Sammelrohr der Niere

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

vorgelegt von:

Julian Isermann

aus Peine

Kiel 2022

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Bleich
2. Berichterstatterin / Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Krautwald

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 21.08.2022

gez.: Prof. Dr. med. Markus Bleich

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Die Niere als Schaltstelle des Stoffwechsels	1
1.2 Anatomie der Niere	1
1.2.1 Makroskopischer Aufbau der Niere	1
1.2.2 Mikroskopischer Aufbau - das Nephron als Funktionseinheit	2
1.3 Elektrolyttransport im Sammelrohr (CD)	5
1.3.1 Transportvorgänge der Hauptzellen (PC).....	5
1.3.2 Transportvorgänge der Schaltzellen (IC).....	7
1.3.3 Chloridtransport im Sammelrohr (CD)	7
1.4 Der parazelluläre Transportweg, <i>Tight Junctions (TJ)</i> und Claudine.....	8
1.4.1 Claudine im Sammelrohr (CD).....	10
1.5 Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes im Sammelrohr (CD)	12
1.5.1 Antidiuretisches Hormon (ADH).....	12
1.5.2 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	13
1.5.3 <i>With-No-Lysine Kinases (WNK)</i>	15
1.5.4 Medikamentöse Ansatzpunkte im Sammelrohr (CD)	16
1.5.5 Die Claudin-4 defiziente (KO) Maus	17
1.6 Zielsetzung.....	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Lösungen	19
2.1.3 Versuchstiere.....	22

2.1.4	Diäten	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Genotypisierung	23
2.2.2	Gewinnung von kortikalen Sammelrohren (cCD).....	26
2.2.3	<i>In-vitro</i> Tubulusperfusion	28
2.2.4	Elektrophysiologie der Messungen am Perfusionsarbeitsplatz	33
2.2.5	Datenanalyse	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Salztransport über das Epithel des kortikalen Sammelrohres (cCD)	40
3.1.1	Amilorid und Hydrochlorothiazid verändern transepitheliale Spannung, transepithelialen Widerstand und äquivalenten Kurzschlussstrom von mikroperfundierten kortikalen Sammelrohren	40
3.1.2	Parazellulärer Weg im kortikalen Sammelrohr (cCD) zeigt Anionenselektivität .	41
3.1.3	Korrelation von transepithelialer Spannung (V_{te}) und Permeabilitätsverhältnis	42
3.2	Elektrophysiologische Eigenschaften bei Claudin-4-Defizienz (KO).....	43
3.2.1	Amilorid und Hydrochlorothiazid (HCT) verändern transepithelialen Widerstand (R_{te}) in Claudin-4 defizienten kortikalen Sammelrohren (cCD) nicht	43
3.2.2	Claudin-4 defiziente kortikale Sammelrohre (cCD) verlieren Selektivität für Cl^- .	44
3.3	Effekt von Niedrig- Na^+ -Diät (NND) auf elektrophysiologische Eigenschaften	47
3.3.1	Amilorid und Hydrochlorothiazid (HCT) enthüllen hohen parazellulären transepithelialen Widerstand (R_{te}) der Claudin-4 defizienten (KO) Sammelrohre (CD)...	48
3.3.2	Niedrig- Na^+ -Diät (NND) hat keinen Einfluss auf die parazelluläre Selektivität....	49
3.4	Inkubation mit Niedrig- Cl^- -Lösung verändert die Ionenselektivität.....	51
3.4.1	Transzelluläre Eigenschaften vor Inkubation zeigen ähnliche Ausgangsbedingungen	52
3.4.2	Veränderungen im transepithelialen Widerstand (R_{te}) nach 15 Minuten Inkubation	52

3.4.3 Niedrig-Cl ⁻ -Inkubation erhöht die Cl ⁻ -Permeabilität (P_{Cl}) in Abhängigkeit von Claudin-4	53
4 Diskussion.....	56
4.1 Methodische Limitationen	56
4.1.1 Homogenität der Versuchstiere in Bezug auf Alter und Geschlecht	56
4.1.2 Claudin-4 defiziente Maus.....	56
4.1.3 <i>In-vitro</i> Tubulusperfusion	57
4.2 Transzelluläre Transporteigenschaften im Sammelrohr.....	58
4.2.1 Transzellulärer elektrogener Natriumtransport unter Standard-Natrium-Diät (SND) ..	58
4.2.2 Effekt von Niedrig-Na ⁺ -Diät (NND) auf transzelluläre Transporteigenschaften ..	59
4.2.3 Erkenntnisse durch Hemmung des transzellulären Transportes	61
4.3 Parazelluläre Transporteigenschaften des kortikalen Sammelrohres (cCD)	62
4.3.1 Chloridselektivität des Sammelrohres (CD) in Kontrollen (KT)	62
4.3.2 Erkenntnisse durch Claudin-4-Defizienz (KO)	63
4.3.3 Einfluss einer Niedrig-Na ⁺ -Diät (NND) auf parazelluläre Eigenschaften	64
4.3.4 Einfluss einer Niedrig-Cl ⁻ -Inkubation auf parazelluläre Eigenschaften in Abhängigkeit von Claudin-4	65
4.4 Physiologische Relevanz.....	67
4.5 Ausblick.....	69
5 Zusammenfassung	71
6 Literatur.....	72
7 Anhang	82
7.1 Versuchstiere.....	82
8 Danksagung.....	83

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon
AQP	Aquaporin
bp	Basenpaare
CA	Carboanhydrase
cCD	kortikales Sammelrohr
CD	Sammelrohr
CNT	Verbindungstubulus (<i>connecting tubule</i>)
DCT	distaler gewundener Tubulus (<i>distal convoluted tubule</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Diffusionspotenzial
ENaC	epithelialer Na ⁺ -Kanal
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HCT	Hydrochlorothiazid
I _{sc}	äquivalenter Kurzschlussstrom
IC	Schaltzelle (<i>intercalated cell</i>)
IM	Inneres Mark (<i>inner medulla</i>)
ISOM	Innerer Streifen des äußeren Marks (<i>inner stripe of outer medulla</i>)
JAM	<i>Junction-Adhesion-Molecules</i>
KO	<i>Knockout</i> (hier: Claudin-4-Defizienz) (e.g. KO-Sammelrohr, KO-Maus)
KT	Kontrollgruppe (e.g. KT-Sammelrohre, KT-Mäuse)
NKCC2	Na ⁺ -K ⁺ -2 Cl ⁻ -Kotransporter
NND	Niedrig-Na ⁺ -Diät
OSOM	Äußerer Streifen des äußeren Marks (<i>outer stripe of outer medulla</i>)
PC	Hauptzelle (<i>principal cell</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PT	Proximaler Tubulus
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROMK	K ⁺ -Kanal (<i>renal outer medullary K⁺ channel</i>)
R _{te}	transepithelialer Widerstand
SND	Standard-Na ⁺ -Diät
TAL	Dicke aufsteigende Henle- Schleife (<i>thick ascending limb of Henle</i>)
TJ	<i>Tight Junction</i>
TL	Dünne Henle-Schleife (<i>thin limb of Henle</i>)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V _{te}	transepithiale elektrische Spannung
WNK	<i>With-No-Lysine Kinase</i>

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ANATOMIE DER HUMANEN UND MURINEN NIERE IM VERGLEICH	2
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES NEPHRONS.....	3
ABBILDUNG 3: TRANSPORTPROZESSE IM SAMMELROHR.....	6
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE <i>TIGHT JUNCTION</i> DARSTELLUNG	9
ABBILDUNG 5: HORMONELLE REGULATION DES TRANSZELLULÄREN TRANSPORTES DER HAUPTZELLEN	13
ABBILDUNG 6: HEMMSTOFFE DES TRANSZELLULÄREN TRANSPORTES	17
ABBILDUNG 7: KREUZUNGSSCHEMA KONTROLL-WEIBCHEN UND CLAUDIN-4 DEFIZIENTES MÄNNCHEN.....	22
ABBILDUNG 8: SCHEMA DER GENOTYPISIERUNGS POLYMERASE-KETTEN-REAKTION.....	25
ABBILDUNG 9: GEL NACH PCR ZUR GENOTYPISIERUNG	26
ABBILDUNG 10: GRAFIK EINER RECHTEN NIERE (ANTERIORE ANSICHT)	27
ABBILDUNG 11: NIERENSCHIEBE (A) UND KORTIKALES SAMMELROHR (CCD) (B).....	28
ABBILDUNG 12: SCHEMA DES PERfusionssystems.....	30
ABBILDUNG 13: BEARBEITUNG DER KONSTRUKTIONSPIPETTE	31
ABBILDUNG 14: PERfusionssARBEITSPLATZ	32
ABBILDUNG 15: ORIGINALEXPERIMENT (KONTROLLE, NIEDRIG- Na^+ -DIÄT).....	37
ABBILDUNG 16: ORIGINALEXPERIMENT DER Cl^- -INKUBATION (KONTROLLE, INKUBATION KONTROLLLÖSUNG)	38
ABBILDUNG 17: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VOR UND NACH APPLIKATION VON AMILORID UND HYDROCHLOROTHIAZID IN KONTROLLEN UNTER STANDARD- Na^+ -DIÄT.....	41
ABBILDUNG 18: DIFFUSIONSPOTENZIALE UND PERMEABILITÄTEN FÜR DIE IONEN Na^+ UND Cl^- IM KORTIKALEN SAMMELROHR (CCD) IN KONTROLLEN UNTER STANDARD- Na^+ -DIÄT	42
ABBILDUNG 19: KORRELATION VON TRANSEPITHELIALER SPANNUNG UND PERMEABILITÄTSVERHÄLTNIS IN KONTROLLEN.....	42
ABBILDUNG 20: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VOR UND WÄHREND APPLIKATION VON AMILORID UND HYDROCHLOROTHIAZID IN KONTROLLEN UND CLAUDIN-4-DEFIZIENZ.....	44
ABBILDUNG 21: ORIGINALEXPERIMENT KONTROLL- UND CLAUDIN-4 DEFIZIENTES-SAMMELROHR UNTER STANDARD- Na^+ -DIÄT	45
ABBILDUNG 22: PARAZELLULÄRE EIGENSCHAFTEN VON CLAUDIN-4 DEFIZIENTEN UND KONTROLL-SAMMELROHREN IM VERGLEICH..	46
ABBILDUNG 23: AUFTRAG VON TRANSEPITHELIALER SPANNUNG UND PERMEABILITÄTSVERHÄLTNIS IN CLAUDIN-4 DEFIZIENTEN TIEREN	46
ABBILDUNG 24: ORIGINALEXPERIMENT EINER KONTROLLE UND EINES CLAUDIN-4 DEFIZIENTEN SAMMELROHRES UNTER NIEDRIG- Na^+ - DIÄT.....	47

ABBILDUNG 25: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON KORTIKALEN SAMMELROHREN BEI CLAUDIN-4-DEFIZIENZ UND IN KONTROLLEN UNTER NIEDRIG- Na^+ -DIÄT IM VERGLEICH MIT STANDARD- Na^+ -DIÄT	48
ABBILDUNG 26: DIFFUSIONSPOTENZIALE, PERMEABILITÄTSVERHÄLTNISSE UND ABSOLUTE PERMEABILITÄTEN DER VERSCHIEDENEN EXPERIMENTALGRUPPEN	50
ABBILDUNG 27: AUFTRAG VON TRANSEPITHELIALER SPANNUNG UND PERMEABILITÄTSVERHÄLTNIS IN KONTROLLEN UND CLAUDIN-4 DEFIZIENTEN SAMMELROHREN UNTER NIEDRIG- Na^+ -DIÄT.....	51
ABBILDUNG 28: ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VOR BEGINN DER INKUBATION.....	52
ABBILDUNG 29: TRANSEPITHELIALER WIDERSTAND NACH INKUBATION	53
ABBILDUNG 30: ORIGINALEXPERIMENTE NIEDRIG- Cl^- -INKUBATION IN KONTROLLE UND CLAUDIN-4 DEFIZIENTER MAUS	54
ABBILDUNG 31: PARAZELLULÄRE IONENPERMEABILITÄTEN NACH INKUBATION	55

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: FRAKTIONELLE RESORPTION UND FRAKTIONELLE AUSSCHEIDUNG VON SALZ UND WASSER ENTLANG DES NEPHRONS.....	4
TABELLE 2: KONTROLLLÖSUNG	19
TABELLE 3: 30- Na^+Cl^- -LÖSUNG	20
TABELLE 4: KONTROLLLÖSUNG MgSO_4	20
TABELLE 5: NIEDRIG- Cl^- -INKUBATIONSLÖSUNG.....	20
TABELLE 6: BASISLÖSUNG.....	21
TABELLE 7: INKUBATIONSLÖSUNG.....	21
TABELLE 8: SORTIERLÖSUNG	21
TABELLE 9: IONENGEHALT DER DER DIÄTEN ZUR MAUSZUCHT.....	23
TABELLE 10: ANSATZ DER POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)	24
TABELLE 11: EINTEILUNG DER EXPERIMENTALGRUPPEN	51

1 Einleitung

1.1 Die Niere als Schaltstelle des Stoffwechsels

Die Niere erfüllt essenzielle Funktionen für den Organismus und ist neben der Elimination harnpflichtiger Stoffe für die Homöostase von Elektrolyten und Wasser verantwortlich. Dadurch reguliert sie unter anderem das Extrazellulärvolumen und nimmt Einfluss auf den Blutdruck (Crowley and Coffman 2012). Darüber hinaus ist sie, neben Lunge und Leber, an der Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Säure-Basen-Haushalts beteiligt. Um diesen vielfältigen Aufgaben kontrolliert nachzukommen, produziert die Niere Hormone und Botenstoffe und ist Wirkpunkt einer Vielzahl dieser Stoffe (Klinke 2005).

Die herausragende Stellung der Niere zeigt sich auch darin, dass 20% des Herzzeitvolumens die Nieren passieren. Ein Großteil des Blutflusses beschränkt sich hierbei auf die stärker durchblutete Nierenrinde (Abbildung 1A und B). Dort sind die meisten Glomeruli zu finden. Die menschlichen Nieren bestehen aus circa 2 Millionen, die murine Niere aus 13000 Glomeruli (Cullen-McEwen, Kett et al. 2003). In den Glomeruli werden beim Menschen pro Tag insgesamt 150 bis 180 Liter Primärharn filtriert, welcher anschließend entlang des Nephrons modifiziert wird (Schmidt 2010) (siehe 1.2.2).

1.2 Anatomie der Niere

1.2.1 Makroskopischer Aufbau der Niere

Makroskopisch lässt sich die menschliche Niere in sieben bis neun *Lobi Renales* einteilen, die von der äußeren Nierenrinde in das Mark hineinreichen. Das Mark ist pyramidenförmig angeordnet, wobei die Spitze stets in das Nierenbecken hineinragt (Abbildung 1A). Die Nierenrinde ist circa einen Zentimeter breit und ist einerseits an der Außenseite der Niere zu finden, setzt sich aber als *Columna Renalis* auch zwischen den Markpyramiden fort (Lüllmann-Rauch 2019).

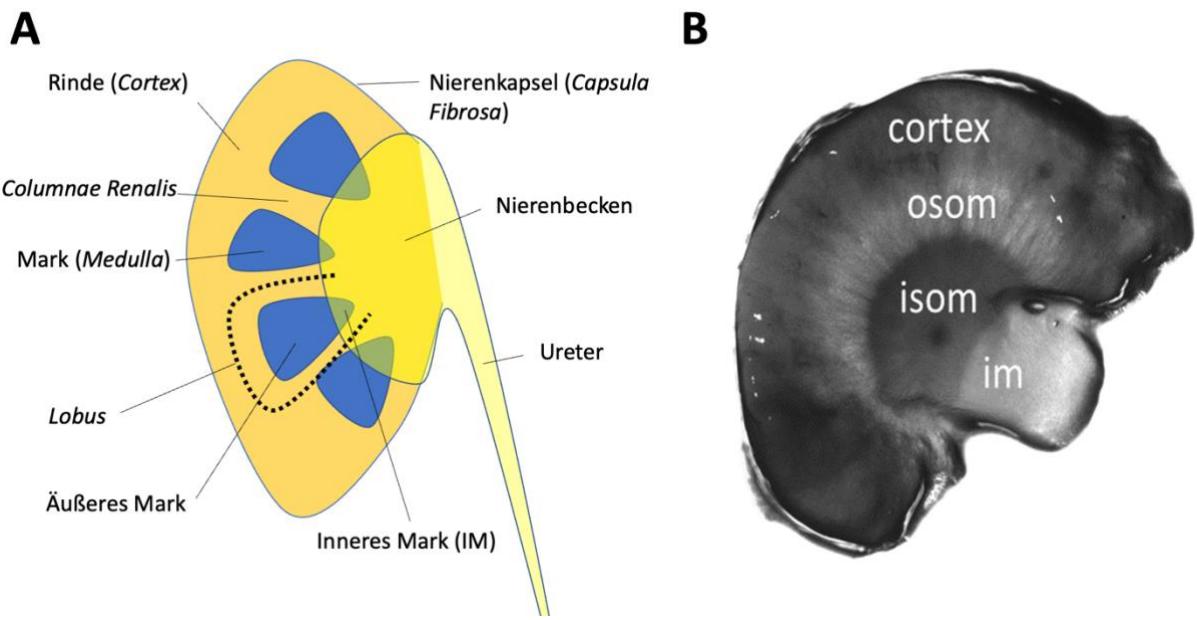


Abbildung 1: Anatomie der humanen und murinen Niere im Vergleich

A: Schematische Darstellung der humanen Niere im Längsschnitt. Der Übersichtlichkeit halber sind nur vier statt der eigentlich sieben bis neun Lobi angedeutet. Die Markpyramiden sind blau hinterlegt. Die Tubulusflüssigkeit gelangt aus den Papillen der Lobi in das Kelchsystem des Nierenbeckens. B: Horizontalschnitt einer murinen Niere im Durchlicht. Die murine Niere hat nur einen Lobus. Die Gliederung in Schichten erfolgt analog zu der humanen Niere und ist hier eingezeichnet: Cortex, äußerer Streifen des äußeren Marks (*outer stripe of outer medulla*, OSOM), innerer Streifen des äußeren Marks (*Inner Stripe Of Outer medulla*, ISOM), inneres Mark (*inner medulla*, IM). Die Abgrenzung der Schichten ergibt sich aus den darin vorkommenden Tubulusabschnitten. A: nach (Lüllmann-Rauch 2019).

Die Niere der Maus ist im Vergleich einfacher aufgebaut, da sie nur aus einem Lobus besteht, also eine Markpyramide besitzt (Abbildung 1B). Diese Markpyramide konfluert durch eine breite Basis mit der Nierenrinde und reicht zentral ebenfalls bis in das Nierenbecken. Dabei werden äußeres und inneres Mark unterschieden, wobei das äußere Mark in einen Außenstreifen (*outer stripe of outer medulla*, OSOM) und einen Innenstreifen (*inner stripe of outer medulla*, ISOM) unterteilt wird (siehe Abbildung 1B) (Liebelt 1998).

1.2.2 Mikroskopischer Aufbau - das Nephron als Funktionseinheit

Das Nephron stellt die funktionell-histologische Untereinheit der Niere dar. Es besteht aus einem Glomerulus, in dem der Primärharn filtriert wird und dem sich anschließenden Tubulussystem, welches letztendlich in das Kelchsystem des Nierenbeckens mündet (Abbildung 2) (Lüllmann-Rauch 2019). In der Terminologie wird das Sammelrohr (CD, *collecting duct*) uneinheitlich behandelt. Entwicklungsgeschichtlich zählt es nicht zum Nephron und ist anatomisch gesehen deshalb davon zu trennen. In vielen Disziplinen, die das Nephron vornehmlich funktionell betrachten, wird das CD zum Nephron gezählt (Lüllmann-Rauch

2019). Auch in dieser Arbeit wird diese funktionelle Einteilung verwendet. Eine weitere Unterscheidung erfolgt zwischen kortikalem (cCD, *cortical collecting duct*) und medullärem CD (mCD), (Lüllmann-Rauch 2019). Die Versuche dieser Arbeit wurden an unverzweigten cCD durchgeführt.

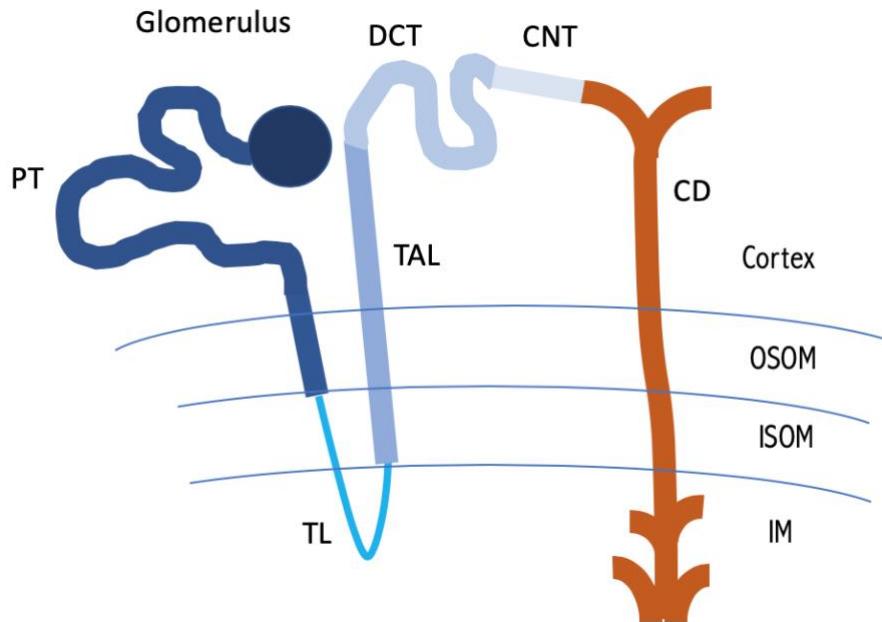


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Nephrons

Die Grafik zeigt den schematischen Aufbau eines kompletten Nephrons. Im Glomerulus entsteht durch Filtration des Blutes der Primärharn, welcher anschließend die unterschiedlichen Abschnitte des Nephrons passiert. Durch viele Modifikationen im Verlauf des Nephrons entsteht der Endharn, der über das Sammelrohr (CD) in das Nierenkelchsystem abgeleitet wird. OSOM= Äußerer Streifen des äußeren Markes (*outer stripe of outer medulla*), ISOM= Innerer Streifen des äußeren Markes (*inner stripe of outer medulla*), IM= Inneres Mark (*inner medulla*), PT= Proximaler Tubulus, TL= dünne Henle-Schleife (*thin limb*), TAL= dicke aufsteigende Henle-Schleife (*thick ascending limb*), DCT= distaler Tubulus (*distal convoluted tubule*), CNT= Verbindungsstück (*connecting tubule*), CD= Sammelrohr (*collecting duct*).

Die beim Menschen circa 150 bis 180 Liter filtrierter Primärharn gleichen in ihrer Zusammensetzung dem proteinfreien Blutplasma. Entlang des Nephrons findet eine starke Veränderung und Anpassung der luminalen Flüssigkeit bis hin zum finalen Urin statt. Es wird ein Gleichgewicht zwischen Ausscheidung und Einbehalt von Ionen, anderen Molekülen und Wasser erreicht. Dabei werden einige wichtige Elektrolyte und organische Stoffe aktiv rückresorbiert, andere Stoffe werden aktiv sezerniert (Klinke 2005). Zudem ist die Fähigkeit der Niere hervorzuheben, den Urin entweder konzentrieren oder sogar verdünnen zu können. So kann die Wasserausscheidung dem diskontinuierlichen Trinkverhalten angepasst und die Plasmaosmolalität weitestgehend konstant gehalten werden (Klinke 2005, Brandes 2019).

Im proximalen Tubulus (PT, *proximal tubule*) (Abbildung 2) findet vor allem ein Massentransport von Ionen und Wasser statt (Tabelle 1) (Brandes 2019). Hier werden große Anteile der filtrierten Ionen gegen relativ geringe Gradienten rückresorbiert. Die geringen Konzentrationsgradienten bedingen sich daraus, dass Ionen und Wasser in nahezu gleichem Maße transportiert werden. Eine weitere Aufgabe im PT ist es, Giftstoffe und auch Medikamente aktiv durch spezielle Transporter zu sezernieren (Klinke 2005, Brandes 2019).

In der wasserundurchlässigen dicken aufsteigenden Henle-Schleife (TAL, *thick ascending limb of Henle*) (vgl. Abbildung 2) werden weitere Ionen rückresorbiert. Vor allem aber ist die Henle-Schleife wichtig für die Konzentrierung des Urins, da hier Salz und Wasser getrennt werden und mit Hilfe eines Gegenstromprinzips ein osmotischer Gradient mit zunehmender Osmolalität in Richtung Mark aufgebaut wird (Brandes 2019).

Im distalen gewundenen Tubulus (DCT, *distal convoluted tubule*) und CD (Abbildung 2) findet die Feineinstellung des Wasser- und Elektrolytgehalts des Urins statt. Im Vergleich zu PT und TAL findet hier Salztransport gegen höhere Gradienten unter höherem Energieverbrauch und unter direkter hormoneller Kontrolle, jedoch in deutlich geringerem Umfang statt (siehe Tabelle 1) (Schmidt 2010). Unter hormoneller Kontrolle durch antidiureisches Hormon (ADH) und unter Ausnutzung des osmotischen Gradienten, der durch das Gegenstromprinzip der Henle-Schleife aufgebaut wurde, kann im CD Wasserrückresorption stattfinden oder Wasser vermehrt ausgeschieden werden (Brandes 2019). Für das CD sollen die Transportvorgänge im Einzelnen und genauer im nächsten Abschnitt aufgeschlüsselt werden.

	PT	TAL	DCT & CNT	CD	Fraktionelle Ausscheidung
Na ⁺	60%	25%	6-10%	0-1%	0,5%-5%
Cl ⁻	55%	35%	9%	0-2%	0,5%-5%
H ₂ O	60%	20%	19%	0-3%	0,5%-7%

Tabelle 1: Fraktionelle Resorption und fraktionelle Ausscheidung von Salz und Wasser entlang des Nephrons.
Im proximalen Tubulus (PT) findet eine sehr starke Resorption von Elektrolyten und Wasser gegen geringe Gradienten statt. Die Henle-Schleife ist vor allem für die Konzentrierung des Harns wichtig. Die hormonelle Einstellung der fraktionellen Ausscheidung von Salz und Wasser findet vor allem im distalen Konvolut (DCT), Verbindungstubulus (CNT) und Sammelrohr (CD) statt. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die filtrierte Menge. Nach: Klinke 2005, Palmer and Schnermann 2015, Pearce, Soundararajan et al. 2015, Layton, Vallon et al. 2016, Brandes 2019

1.3 Elektrolyttransport im Sammelrohr (CD)

Im CD wird die Tubulusflüssigkeit aus bis zu elf vorgeschalteten Nephronen zusammengeführt (Lüllmann-Rauch 2019). Sie wurde bis dahin schon weitgehend verändert, praktisch alle Aminosäuren, Glukose und viele Elektrolyte wurden rückresorbiert und nur ungefähr ein Zehntel des filtrierten Wassers sind noch im Tubuluslumen zu finden (Pearce, Soundararajan et al. 2015). Der Transport im CD hat daher einen eher geringen Umfang, ist jedoch hormonell reguliert und sehr variabel in seiner Ausprägung (Tabelle 1) (Pearce, Soundararajan et al. 2015). Nach abschließender Feineinstellung des Salz- und Wasser-Haushalts wird der Harn im Nierenbecken den ableitenden Harnwegen zugeleitet. Durch sich stetig weiter vereinigende CD münden beim Menschen letztlich eine Millionen Nephrone über einige papillennahe CD in das Nierenbeckenkelchsystem (Klinke 2005). Die vorherrschenden Zelltypen im CD sind Hauptzellen (PC, *principal cells*). Dazwischen sind immer wieder Schaltzellen (IC, *intercalated cells*) eingestreut, wobei hier drei verschiedene Typen unterschieden werden: IC A, IC B und IC *non A/non B* (Abbildung 3) (Roy, Al-bataineh et al. 2015).

1.3.1 Transportvorgänge der Hauptzellen (PC)

Die PC sind die Hauptakteure im Na^+ -Transport des CD. Die basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase transportiert drei Na^+ aus der Zelle heraus und schleust zwei K^+ in das Zellinnere. Der so entstehende elektrochemische Gradient für Na^+ erlaubt die Resorption durch den epithelialen Na^+ -Kanal (ENaC, *epithelial Na⁺ channel*), welcher luminal, also harnseitig, in den PC vorzufinden ist (Abbildung 3 oben) (Pearce, Soundararajan et al. 2015, Brandes 2019).

Luminale K^+ -Kanäle (ROMK, *renal outer medullary K⁺ channels*) ermöglichen K^+ -Sekretion, wobei jedoch der luminale Einstrom von Na^+ den luminalen K^+ -Ausstrom überwiegt. Zusätzlich erlauben basolaterale K^+ -Kanäle die Hyperpolarisation der basolateralen Membran im Vergleich zu der durch Na^+ -Einstrom depolarisierten luminalen Membran (Abbildung 3). Durch diese asymmetrische Potenzialverteilung über die Zellmembran ergibt sich ein transepitheliales elektrisches Potenzial (V_{te}), welches in diesem Falle lumennegativ ist. V_{te} ist wiederum selbst eine elektrische Triebkraft für weitere Transportvorgänge zwischen den Zellen.

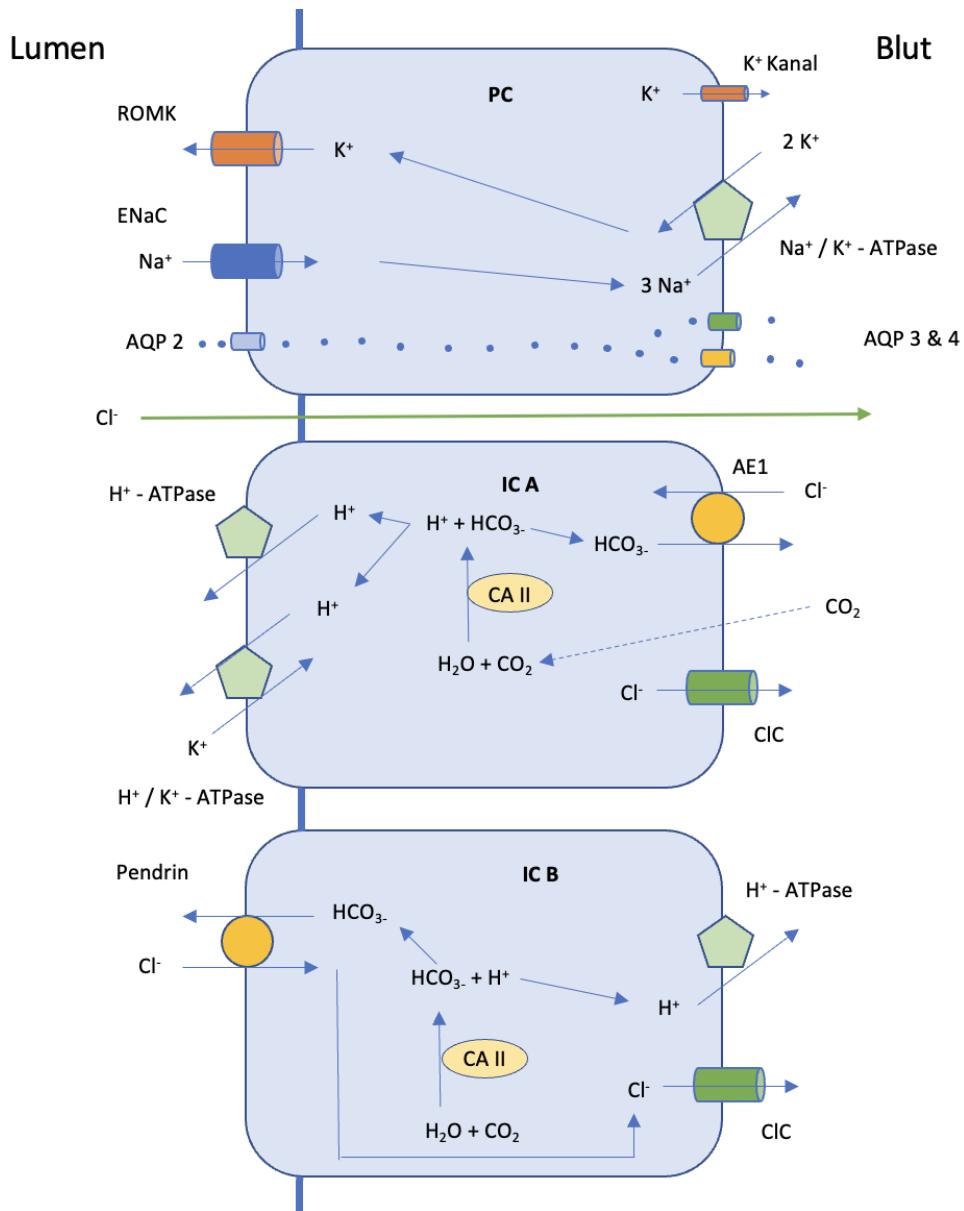


Abbildung 3: Transportprozesse im Sammelrohr

Links: Tubuluslumen - „Harnseite“, rechts: basolaterales Kompartiment - „Blutseite“. Die Abbildung zeigt eine Hauptzelle (PC, oben) und die beiden verschiedenen Typen der Schaltzellen (IC A, IC B, weiter unten). Die Hauptzellen transportieren über den ENaC Na^+ über die luminale Zellmembran. Dieser Transport ist angetrieben durch die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase. K^+ verlässt die Zelle luminal über den ROMK. Das entstehende lumennegative Potenzial dient als Triebkraft für Cl^- , das parazellulär über die Tight Junction (TJ) aus dem Harn resorbiert werden kann. In den Schaltzellen Typ A erfolgt vor allem die Sekretion von H^+ , zum Teil im Austausch gegen K^+ . Durch die Carboanhydrase II (CA II) gebildetes HCO_3^- wird über den Anionenaustauscher 1 (AE1) basolateral im Austausch gegen Cl^- aus der Zelle geschleust. Cl^- verlässt die Zelle über einen Cl^- -Kanal (CIC). In den Schaltzellen Typ B wird HCO_3^- luminal über Pendrin gegen Cl^- getauscht, welches ebenfalls über den Cl^- -Kanal basolateral die Zelle verlässt. Über die Carboanhydrase wird H^+ gebildet, welches die Zelle basolateral über die H^+ -ATPase verlässt. (Wagner, Devuyst et al. 2009, Eladari and Hubner 2011, Hadchouel, Busst et al. 2011, Eladari, Chambrey et al. 2012, Pearce, Soundararajan et al. 2015, Roy, Al-bataineh et al. 2015, Hou 2016)

1.3.2 Transportvorgänge der Schaltzellen (IC)

Neben den PC sind auch die IC an Transportprozessen beteiligt (Schuster and Stokes 1987).

Diese sind vor allem für die Säure-Basen-Homöostase verantwortlich.

Die IC A sind dabei vorrangig für die Sekretion von H^+ zuständig, welche entweder über die H^+ -ATPase oder bei K^+ Mangel durch die H^+/K^+ -ATPase im Austausch gegen K^+ erfolgt (Abbildung 3) (Brandes 2019). Um H^+ -Ionen sezernieren zu können, benötigt es die Carboanhydrase (CA). Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von $CO_2 + H_2O$ zu Kohlensäure, die dann zu $HCO_3^- + H^+$ dissoziert. Das dabei anfallende HCO_3^- , welches in den IC A über die apikal liegende CA II gebildet wurde, wird dann basolateral über einen Cl^-/HCO_3^- Austauscher (AE1, *anion exchanger I*) gegen Cl^- ausgetauscht (Abbildung 3) (Asensio Sanchez, Perna Monroy et al. 2004, Mohebbi, Perna et al. 2013, Roy, Al-bataineh et al. 2015). So kann effektiv eine Ansäuerung des Urins vollzogen und H^+ aus dem Körper eliminiert werden.

Die IC B sind für die Sekretion von HCO_3^- verantwortlich. Diese geschieht apikal über den Cl^-/HCO_3^- Austauscher Pendrin (Brown, Hirsch et al. 1988, Royaux, Wall et al. 2001, Wall, Hassell et al. 2003). Das HCO_3^- wird für diesen Transport ebenfalls durch die CA II gebildet (Abbildung 3). Die Triebkraft für diesen Transport kommt durch die basolateral exprimierte H^+ -ATPase zustande. Dort werden H^+ Ionen in das Plasma befördert (Abbildung 3) (Brown, Hirsch et al. 1988, Pech, Zheng et al. 2008, Wagner, Devuyst et al. 2009). Fehlt dem Organismus der apikale Transporter Pendrin (Pendred-Syndrom, Mutation im *SLC26A4*-Gen, OMIM Phenotypnummer 274600, Genlocusnummer 605646), zeigen sich unter Normalbedingungen keine Manifestationen an der Niere (Royaux, Wall et al. 2001, Kopp and Bizeanova 2011, Kopp 2014, Wemeau and Kopp 2017). Fällt jedoch vermehrt HCO_3^- an, zeigen sich schwere metabolische Alkalosen. Basen können dann nicht mehr über den Urin ausgeschieden werden (Kim, Verlander et al. 2005, Roy, Al-bataineh et al. 2015).

1.3.3 Chloridtransport im Sammelrohr (CD)

Es wurde lange davon ausgegangen, dass die blutdrucksteigernde Wirkung von einem erhöhtem NaCl-Gehalt der Nahrung vor allem auf das Na^+ zurückzuführen sei. Es zeigte sich aber, dass eine erhöhte Na^+ -Aufnahme zusammen mit anderen Anionen, z. B. Citrat, den Blutdruck nicht steigerte. Offensichtlich kommt also der regulierten Cl^- -Resorption eine

besondere Rolle im CD zu (Kurtz and Morris 1984, Whitescarver, Ott et al. 1984, Kurtz, Al-Bander et al. 1987). Dafür sind zwei Wege beschrieben.

Einerseits zeigen Erkenntnisse, dass IC Typ B transzellulär Cl^- resorbieren können. Über Pendrin kann Cl^- in die Zelle gelangen und letztlich basolateral über einen Cl^- -Kanal die Zelle verlassen (Abbildung 3). Dieser Transport wäre im Gegensatz zu dem der Hauptzellen nicht elektrogen (Schuster and Stokes 1987, Leviel, Hübner et al. 2010, Eladari, Chambrey et al. 2012, Mohebbi, Perna et al. 2013). Dies lässt auch Pendrin als einen möglichen Einflussfaktor des arteriellen Blutdrucks in Erscheinung treten (Kurtz, Al-Bander et al. 1987, Verlander, Kim et al. 2006).

Neben diesem recht neuen transzellulären Weg wird Cl^- vor allem parazellulär resorbiert. Die Triebkraft für diesen Transport ist das lumennegative V_{te} , welches durch transzelluläre Na^+ -Resorption der Hauptzellen erzeugt wird (vgl. 1.3.1). So kann Cl^- parazellulär resorbiert werden (Abbildung 3) (Pearce, Soundararajan et al. 2015, Hou 2016). Dazu bedarf es einer passiven Leitfähigkeit des parazellulären Weges für Cl^- . Andererseits muss das transportierende Epithel gegenüber anderen Ionen abgedichtet sein. Dies wird durch Zellmembranen und die Schlussleisten gewährleistet (*TJ, Tight Junction, Zonula occludens*) (vgl. 1.4), welche die Zellzwischenräume verschließen können (Brandes 2019).

1.4 Der parazelluläre Transportweg, *Tight Junctions (TJ)* und *Claudine*

TJ definieren und trennen apikale und basolaterale Zellkompartimente (Farquhar and Palade 1963). Diese Funktion ist für den epithelialen Transport sehr wichtig, da durch die TJ zusammen mit dem Zytoskelett gewährleistet ist, dass die polare Verteilung der Transportproteine wie z. B. ENaC luminal und Na^+/K^+ -ATPase basolateral aufrechterhalten wird. Neben abdichtenden bzw. elektrisch isolierenden Eigenschaften ermöglichen sie außerdem einen kontrollierten Transport von Ionen (Gunzel and Yu 2013). Anfangs unterschied man dabei ausschließlich zwischen undichten (*leaky*) und dichten (*tight*) TJ (Schultz 1972). Diese einfache Aufteilung ist allerdings unzureichend.

Die Claudine, eine Familie von TJ-Proteinen, vermitteln typische Eigenschaften wie Dichtigkeit oder spezifische Permeabilität (Furuse, Fujita et al. 1998, Gunzel and Yu 2013).

Claudine besitzen vier Transmembrandomänen mit zwei extrazellulären Schleifen und intrazellulär gelegenem N- und C-Terminus (Abbildung 4D). Die beiden extrazellulären Schleifen dienen der Interaktion und sind für die Eigenschaft der TJ essenziell. Dabei kann die Interaktion zwischen den einzelnen Claudinen auf zwei Weisen erfolgen. In *cis*-Interaktion sind zwei Claudine in der Schlussleiste derselben Zelle in Kontakt, in *trans*-Interaktion mit Claudinen einer benachbarten Zelle (Abbildung 4C) (Furuse, Sasaki et al. 1999, Mitic, Unger et al. 2003, Van Itallie, Mitic et al. 2011). Die Claudine sind in einen TJ-Komplex eingebunden. Dieser enthält zusätzlich Occludin (Furuse, Hirase et al. 1993) und Proteine, die die TJ im Zytoskelett verankern (z. B. JAM und ZO-1 in Abbildung 4C) (Ebnet, Suzuki et al. 2004, Gunzel and Fromm 2012)

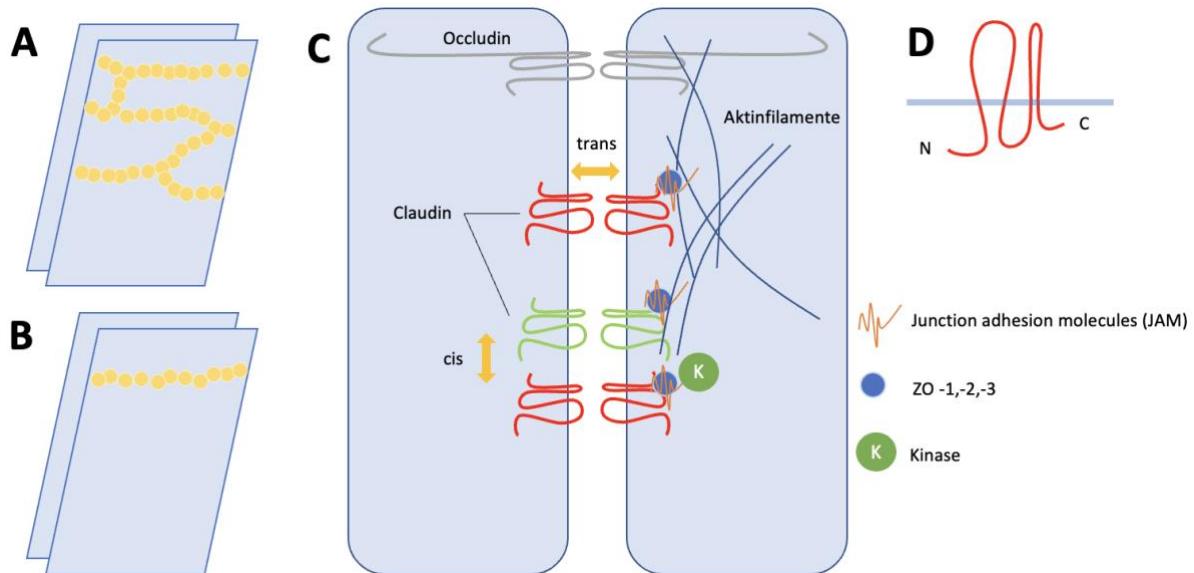


Abbildung 4: Schematische Tight Junction Darstellung

A: Schema eines dichten „tight“ Epithels mit mehrreihigen Tight Junction (TJ) Strängen, wie es im Sammelrohr (CD) zu finden ist. **B:** Schema eines durchlässigen „leaky“ Epithels mit nur einem TJ-Strang. **C:** Schema einer TJ in den Zellmembranen (blau) zweier benachbarter Zellen. Neben Occludin (grau, oben) sind verschiedene Claudine (rot, grün) gezeigt. Diese interagieren mit Claudinen derselben Zelle (*cis*), sowie mit Claudinen der benachbarten Zelle (*trans*). Junction-Adhesion-Molecules (JAM) und ZO Proteine integrieren die Claudine in das Zytoskelett (dunkelblaue Aktinfilamente). Sie binden Claudin am C-Terminus. Dort können auch verschiedene Kinasen binden. Insgesamt sind noch viele weitere Proteine am Aufbau der TJ beteiligt. **D:** Schema eines Claudins mit intrazellulärem N- und C-Terminus sowie vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Schleifen.

Die Claudinfamilie umfasst aktuell 28 Claudine mit einer molekularen Masse von 20-28 kDa (Furuse, Fujita et al. 1998). Das gewebespezifische Zusammenspiel unterschiedlicher Claudine vermittelt letztendlich gewebetypische parazelluläre Transporteigenschaften. Neben der Claudinkomposition bestimmt auch die Anzahl der Schlussleistenkomplexe die Dichtigkeit des Epithels (in Abbildung 4C sind exemplarisch 3 TJ-Komplexe dargestellt) (Claude and Goodenough 1973).

In letzter Zeit haben Claudine große klinische Bedeutung erlangt, da sie an zahlreichen humanen Erkrankungen beteiligt sein können (Sawada, Murata et al. 2003, Mineta, Yamamoto et al. 2011). Unter anderem sind sie in der Karzinogenese und Tumorprogression in den Fokus gerückt. Sie sind entscheidend für die Bestimmung des extrazellulären Milieus von Tumoren (Agarwal, D'Souza et al. 2005, Kojima, Yamaguchi et al. 2013, Osanai, Takasawa et al. 2017). Auch spielen sie in der Dermatologie eine wichtige Rolle, da sie an der Bildung und Aufrechterhaltung der natürlichen Barriere der Haut beteiligt sind (Basler and Brandner 2017). Zudem zeigte sich auch, dass TJ und somit Claudine direkt in zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose einzugreifen scheinen (Matter and Balda 2003, Chiba, Osanai et al. 2008, Akasaka, Sato et al. 2010, Kwong and Perry 2013). Außerdem sind inzwischen einige sogenannte Claudinopathien bekannt. Das Fehlen bestimmter Claudine durch Mutation führt zu charakteristischen monogenetischen Erkrankungen. Bei Verlust der renalen Claudine 16 oder 19, welche typischerweise in der TAL vorkommen, manifestiert sich die Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC, *familial hypomagnesiamia with hypercalciuria and nephrocalcinosis*, OMIM Phenotypnummer: 248190, Gen-/Locusnummer: 610036) (Yamaguti, Neves et al. 2017, Alparslan, Öncel et al. 2018, Lu, Zhao et al. 2018). Für Mutationen im Claudin-10 Gen sind Salzverlustsyndrome beschrieben (Breiderhoff, Himmerkus et al. 2012, Milatz 2019).

1.4.1 Claudine im Sammelrohr (CD)

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den Claudinen im CD. Um die Feineinstellung des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes vornehmen zu können, ist im CD ein sehr dichtes Epithel mit transepithelialen Widerständen von mehr als $100 \Omega\text{cm}^2$ (O'Neil RG 1982, O'Neil RG 1984) anzutreffen. So kann geregelter transzellulärer wie auch parazellulärer Transport erfolgen. Aktuell geht man davon aus, dass Claudin-3,-4,-7,-8,-10,-18 und -19 im CD zu finden sind (Abate, Comella et al. 1989, Kiuchi-Saishin, Gotoh et al. 2002, Li, Huey et al. 2004, Ziems, Sonntag et al. 2019).

Claudin-3 gilt generell als abdichtendes Cladin, welches die transepithelialen Widerstände erhöht und dafür sorgt, dass kein ungerichteter parazellulärer Transport oder *backflow*, also Transport von basolateral nach apikal erfolgen kann (Milatz, Krug et al. 2010). Für Cladin-7 konnte in Zellkultur gezeigt werden, dass es die Leitfähigkeit für Cl^- erhöht (durch Hyperphosphorylierung (Tatum, Zhang et al. 2007)) und somit prinzipiell für Cl^- -Transport in

Frage kommen kann. Eine Claudin-7 defiziente Maus zeigte ebenfalls einen schweren renalen Salzverlust und Hypovolämie (Tatum, Zhang et al. 2010). Dem entgegen steht die Erkenntnis, dass sowohl eine Überexpression als auch ein Knockdown von Claudin-7 in Zellkultur die Cl⁻-Permeabilität (P_{Cl}) senken (Hou, Gomes et al. 2006, Alexandre, Jeanssonne et al. 2007). Weitere Daten aus Zellkultur zeigen vor allem eine Erhöhung des transepithelialen Widerstandes (R_{te}) und eine Abnahme der P_{Cl} als auch der Permeabilität für Na⁺ (P_{Na}) (Fan, Tatum et al. 2019). Somit bleibt es schwierig allein Claudin-7 für den parazellulären Cl⁻-Transport im CD verantwortlich zu machen. Auch Claudin-19 ist ein wichtiger Teil des CD, wird jedoch hauptsächlich in medullären und weniger in kortikalen Segmenten exprimiert. Es scheint einen höheren R_{te} zu unterstützen und möglicherweise eine Kationenselektivität zu vermitteln (Ziemens, Sonntag et al. 2019).

Es bleiben vor allem Claudin-4 und -8, welche ebenfalls im CD exprimiert sind. Eine unspezifische, sprich globale Claudin-4-Defizienz (KO, knockout), führte zu einer Hydronephrose, höchstwahrscheinlich infolge einer urothelialen Hyperplasie. Interessanterweise zeigte sich nach globalem KO mehr Claudin-3 und -7 in der TJ, während die generelle Expression der beiden Claudine sich nicht veränderte (Fujita, Hamazaki et al. 2012). In Zellkultur zeigten Hou et al., dass Claudin-4 mit Claudin-8 interagiert, um sich in der TJ anzusiedeln und beobachteten einen Verlust des R_{te} und der P_{Cl} (Hou, Renigunta et al. 2010). Passend dazu wurde beobachtet, dass durch Claudin-8 Defizienz auch Claudin-4 nicht mehr in der TJ nachgewiesen werden konnte (Gong, Wang et al. 2015).

Zusammenfassend sind Claudin-3,-4,-7,-8,-10,-18, und -19 im CD exprimiert (Kiuchi-Saishin, Gotoh et al. 2002, Li, Huey et al. 2004, Ziemens, Sonntag et al. 2019) und bestimmen die parazellulären Eigenschaften.

1.5 Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes im Sammelrohr (CD)

1.5.1 Antidiuretisches Hormon (ADH)

Die Homöostase des Wasserhaushalte, bzw. die Regulation der Ausschüttung des dafür zuständigen Hormons ADH (Brandes 2019) geschieht vor allem über zwei Mechanismen. Zum einen wird das Extrazellularvolumen bzw. das intravaskuläre Volumen über Volumen- und Barorezeptoren der Gefäße bestimmt (Gauer-Henry-Reflex (Brandes 2019)). Zum anderen kommt es bei Zunahme der Plasmaosmolalität durch osmosensitive Neurone im Hypothalamus zu Durstgefühl und über die Hypophyse zur vermehrten Ausschüttung von ADH (Bourque, Oliet et al. 1994, Verbalis 2007). Die Effekte von ADH sind vielfältig. Im CD der Niere wird unter Einfluss von ADH über den V2-Rezeptor (V2R) in den Hauptzellen Aquaporin 2 (AQP 2) (bzw. AQP 3,4 in der basolateralen Membran) (Abbildung 5) in die Membran eingebaut, um transzelluläre Wasser-Rückresorption zu ermöglichen (Nielsen, Chou et al. 1995, Knepper 1997, Knepper and Inoue 1997). So kann die Niere zwischen 0,5 und 20 Liter Wasser pro Tag ausscheiden und für einen ausgeglichenen Wasserhaushalt sorgen.

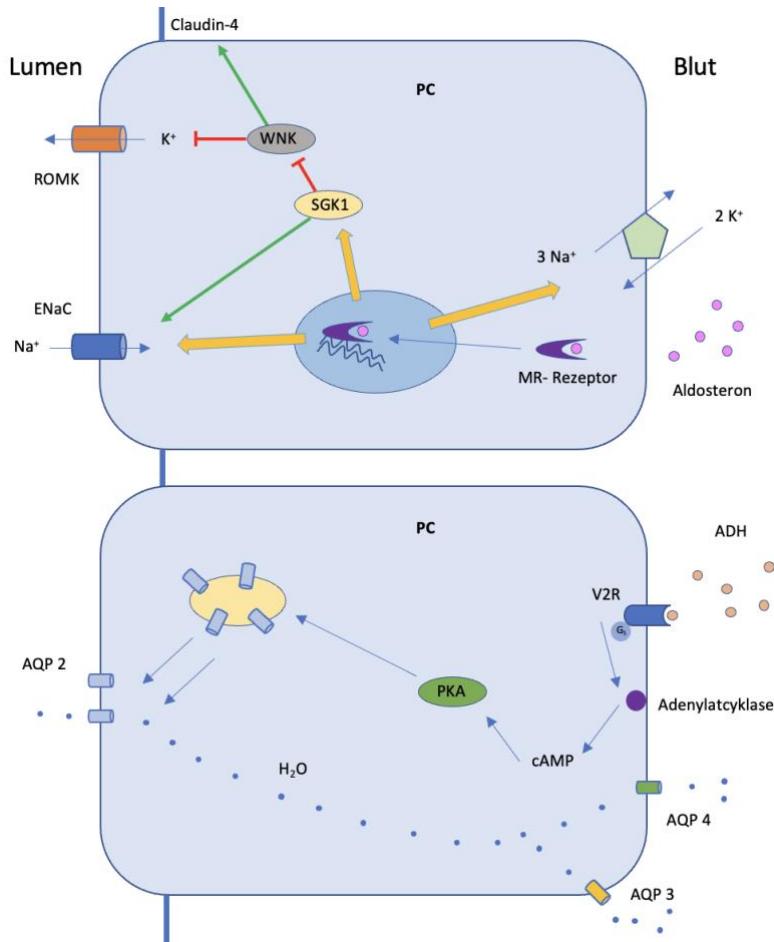


Abbildung 5: Hormonelle Regulation des transzellulären Transportes der Hauptzellen

Die Abbildung zeigt zwei Hauptzellen (PC) aus dem Sammelrohr (CD). Oben ist die Wirkung von Aldosteron, unten von Antidiuretischem Hormon (ADH) gezeigt. Aldosteron wirkt über den intrazellulären Mineralokortikoidrezeptor (MR, violett) und verstärkt die Expression des ENaC sowie der Na⁺/K⁺-ATPase (gelbe Pfeile). Zudem wird SGK1 (*serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1*, gelb) vermehrt exprimiert. Über die Phosphorylierung von Nedd4-2 (nicht gezeigt) wird dadurch der Abbau von EnaC aus der Membran gehindert. Zudem wird der K⁺-Einstrom gefördert. Dazu werden *With-No-Lysine Kinases* (WNK, grau) phosphoryliert, welche dadurch ihre inhibitorischen Eigenschaften auf den ROMK (rot) verlieren. Im unteren Zellmodell ist gezeigt, wie ADH über den V2-Rezeptor (V2R) wirkt und über die Adenylylatzyklase die cAMP-Konzentration der Zelle erhöht. Dies führt unter anderem zu einer verstärkten Aktivität der Proteinkinase A (PKA), welche letztlich Aquaporin 2 (AQP 2) aus Vesikeln durch Verschmelzung in die luminale Membran einbaut. Dadurch kann transzellulärer Wasser-Transport erfolgen (Boone and Deen 2008, Pearce, Soundararajan et al. 2015).

1.5.2 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Der Salzhaushalt wird vor allem über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System streng reguliert, welches einen der Haupteinflüsse auf den arteriellen Blutdruck darstellt (Guyton, Coleman et al. 1972). Die drei Haupttrigger für die Freisetzung von Renin sind vor allem ein fallender arterieller Blutdruck, eine erhöhte sympathische Aktivität und eine veränderte Zusammensetzung der Tubulusflüssigkeit im Sinne eines erniedrigten NaCl-Gehaltes an der *Macula Densa* (Tobian, Tomboulian et al. 1959, Blaine, Davis et al. 1970, Assaykeen, Castellino et al. 1971, Davis and Freeman 1976). Die jeweils gesteigerte Freisetzung von Renin führt über

Angiotensin I und II letztlich zur Freisetzung von Aldosteron (McKenna, Island et al. 1978, Fraser, Brown et al. 1979). Aldosteron ist als Endstrecke des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) verantwortlich für den vermehrten Einbau des ENaC in die Membran der PC im CD. Dadurch wird Na^+ im Austausch gegen K^+ , das über den ROMK luminal die Zelle verlassen kann, rückresorbiert (Abbildung 5). Somit reguliert Aldosteron einerseits die Na^+ -Resorption aber auch die K^+ -Exkretion. Hyperkaliämie ist ein weiterer starker Auslöser für Aldosteronfreisetzung aus der Nebenniere (Verrey 2000). Langfristig führt Aldosteron auch zu einer vermehrten Expression und Membranständigkeit der Na^+/K^+ -ATPase, die Antriebskraft dieses Transportes ist (gelbe Pfeile Abbildung 5) (Vinciguerra, Mordasini et al. 2005). Seine Wirkung entfaltet Aldosteron über den Mineralkortikoidrezeptor (MR) (Abbildung 5) (Schmidt 2010, Pearce, Soundararajan et al. 2015). Eine Hemmung der Aldosteronfunktion an den PC wird durch natriuretische Peptide (z. B. ANP, *atrial natriuretic peptide*) vollzogen, welche bei vermehrter Vorhofdehnung sezerniert werden und das Extrazellularvolumen senken (Guo, Alli et al. 2013). Weitere durch Aldosteron getriggerte Effekte auf den ROMK werden durch *With-No-Lysine-Kinases* (WNK) vermittelt (Abbildung 5 , siehe auch 1.5.3) (Hou, Rajagopal et al. 2013).

Neben einem Einfluss auf die PC des CD scheint Aldosteron auch die Stoffwechselvorgänge in den IC zu steuern. Dabei wird der luminaire K^+ -Kanal BK vermehrt exprimiert, was eine vermehrte K^+ -Exkretion in hyperkaliämischen Zuständen bedingt (Palmer and Frindt 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von Pendrin durch den Einfluss von Aldosteron erhöht (Pech, Zheng et al. 2008, Mohebbi, Perna et al. 2013). Umgekehrt sinkt die Aktivität und die Expression von ENaC durch einen Verlust von Pendrin (Kim, Pech et al. 2007, Leviel, Hübner et al. 2010, Hadchouel, Busst et al. 2011).

Neben den beschriebenen von Aldosteron regulierten transzellulären Transportprozessen gibt es Hinweise, dass Aldosteron auch den parazellulären Weg reguliert. Für Darmepithel konnte gezeigt werden, dass Aldosteron die Expression von Claudin-8 erhöht und somit einen Reflux von Kationen verhindert (Amasheh, Milatz et al. 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass unter Aldosteroneinfluss WNK4 vermehrt phosphoryliert vorliegt (siehe 1.5.3) (Yamauchi, Rai et al. 2004).

1.5.3 With-No-Lysine Kinases (WNK)

Neben den zuvor beschriebenen hormonellen Regulationswege haben die Serin-Threonin-Kinasen WNK in letzter Zeit immer mehr an Bedeutung gewonnen.

WNK besitzen eine Bindungsstelle für Cl⁻ nahe des katalytischen Zentrums, die eine Regulation der WNK vornehmen kann (Lytle and Forbush 1996, Ponce-Coria, San-Cristobal et al. 2008, Piala, Moon et al. 2014). Sie dienen so als intrazelluläre Cl⁻-Konzentrationssensoren (Chen, Lo et al. 2019). Die zytosolische Cl⁻-Konzentration hängt direkt vom Cl⁻-Transport und der extrazellulären Cl⁻-Konzentration ab. Darüber hinaus ist sie abhängig vom Membranpotenzial. Das K⁺-Gleichgewichtspotenzial ist in den meisten Zellen der bestimmende Faktor für das Membranpotenzial. Durch erniedrigte extrazelluläre K⁺-Konzentration und damit hyperpolarisierte Zellmembranen wird die intrazelluläre Cl⁻-Konzentration erniedrigt, was zumindest in Zellkulturen eine erhöhte Aktivität der WNK zeigte (Terker, Zhang et al. 2015, Terker, Zhang et al. 2016).

WNK4 wird unter anderem im DCT und CD exprimiert (Wilson, Disse-Nicodeme et al. 2001). Durch eine Mutation von WNK4 kommt es zum Krankheitsbild des Pseudohyperaldosteronismus II. Bei dieser Erkrankung liegt eine Hypertension und Hyperkaliämie vor (Gordon 1986). Die Hyperkaliämie wird dabei gut durch eine Reduktion der K⁺-Sekretion im CD durch den von WNK4 beeinflussten ROMK erklärt (Abbildung 5) (Wilson, Disse-Nicodeme et al. 2001). Der Mechanismus der erhöhten Salzresorption und dadurch entstehenden Hypertonie dagegen scheint durch eine gesteigerte Na⁺-Cl⁻-Kotransporter-Aktivität im Rahmen einer *gain-of-function* Mutation bedingt zu sein (Wilson, Disse-Nicodeme et al. 2001, Yang, Angell et al. 2003). So kommen Kahle und Wilson zu dem Schluss, dass die WNK als Regulator zwischen K⁺-unabhängiger Na⁺Cl⁻-Resorption im DCT und der Na⁺-Resorption im Austausch gegen K⁺ durch die Hauptzellen des CD fungieren (Bindels 2003, Kahle, Wilson et al. 2003).

Hinzu kommt, dass WNK auch mit dem parazellulären Transport in der Niere in Verbindung gebracht werden. WNK fanden sich an den TJ, führten aber bei Überexpression zu keinen strukturellen Veränderungen an den TJ (Choate, Kahle et al. 2003, Kahle, Gimenez et al. 2004).

Funktionell zeigte sich interessanterweise nach Überexpression von WNK4 ein erniedriger R_{te} und eine erhöhte P_{Cl} (Kahle, Macgregor et al. 2004). Passend dazu wurden Claudin-1,-2,-3 und-

4 durch WNK4 *in-vitro* phosphoryliert (Wilson, Kahle et al. 2003, Yamauchi, Rai et al. 2004, Ohta, Yang et al. 2006). Dies legt posttranskriptionale Regulationsmechanismen der Claudine durch WNK nahe.

1.5.4 Medikamentöse Ansatzpunkte im Sammelrohr (CD)

Da im CD zahlreiche blutdruckdefinierende Transportprozesse ablaufen (siehe 1.3), ist das CD auch ein wichtiger Ansatzpunkt von Medikamenten.

Ein wesentliches am CD wirkendes Medikament ist Amilorid. Es ist in Literatur und Praxis bekannt, dass Amilorid diuretisch wirkt, indem es den ENaC im CD hemmt und somit vermehrt Na^+ und sekundär auch H_2O ausgeschieden werden (Abbildung 6). Die Ausscheidung von K^+ sinkt dementsprechend ab (siehe zu Transportprozessen auch 1.3.1), was dieses Diuretikum zu einem sog. K^+ -sparenden-Diuretikum macht (Loffing and Korbmacher 2009).

Thiazide (wie zum Beispiel Hydrochlorothiazid (HCT)) sind ebenfalls Diuretika und seit langem im klinischen Alltag erprobt. Ihre Funktion beruht dabei auf einer Hemmung des $\text{Na}^+ \text{-Cl}^-$ -Kotransporters im DCT. Neuerdings konnte experimentell jedoch gezeigt werden, dass auch die elektroneutrale $\text{Na}^+ \text{-Cl}^-$ -Resorption durch die IC im CD durch Thiazide gehemmt werden kann (Abbildung 6) (Leviel, Hübner et al. 2010, Eladari and Hubner 2011), wobei unklar bleibt, welchen Angriffspunkt Thiazide dabei nutzen.

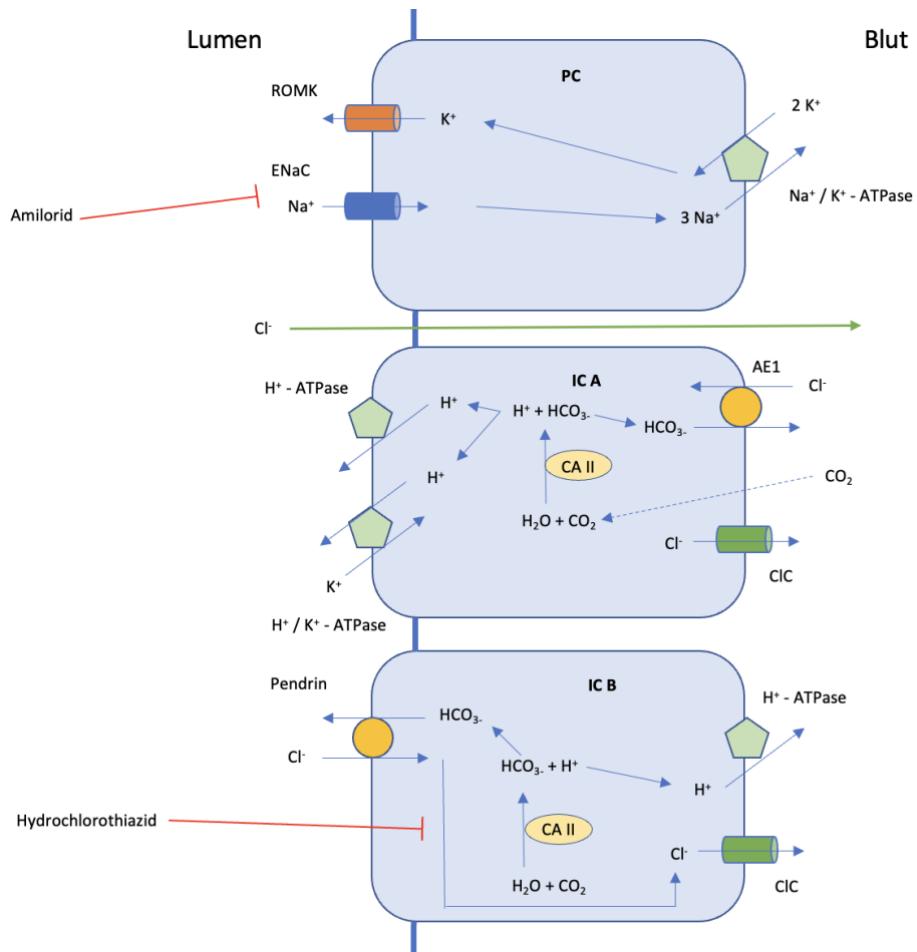


Abbildung 6: Hemmstoffe des transzellulären Transports

Zur Erklärung der Transportvorgänge siehe 1.3 und Abbildung 3. Amilorid hemmt den ENaC, Hydrochlorothiazid (HCT) hemmt experimentell gezeigt den elektroneutralen Transport der Schaltzellen Typ B (IC B) (Loffing and Korbmacher 2009, Eladari and Hubner 2011)

1.5.5 Die Claudin-4 defiziente (KO) Maus

Claudin-4 gilt als eine der kritischen Strukturen der P_{Cl} (Hou, Renigunta et al. 2010). Der globale KO führt zu einer letalen Hydronephrose, die auf eine urothiale Hyperplasie zurückgeführt wird (Fujita, Hamazaki et al. 2012). Es konnte eine lebensfähige Maus etabliert werden, die einen auf das CD und den CNT beschränkten KO besitzt (Gong, Yu et al. 2014) (zur Methodik siehe dazu 2.1.3).

Phänotypisch zeigte sich bei KO eine Hypochloridämie. Diese wurde durch einen hohen renalen Verlust von Cl^- ausgelöst, dessen fraktionelle Exkretion 1,79-fach erhöht war (Gong, Yu et al. 2014). Weiterhin waren auch die fraktionelle Exkretion von Na^+ um das 1,52-fache gestiegen und das Urinvolumen bei gleichem osmotischem Druck des Urins erhöht. Dies wurde als sekundärer Verlust von Wasser aufgrund des Salzverlustes interpretiert. Die GFR war in KO im Vergleich zu Kontrollen nicht unterschiedlich. Der arterielle Blutdruck war in KO

erniedrigt und die Tiere hatten eine erhöhte HCO_3^- Plasmakonzentration bei normwertigem pH-Wert entsprechend einer kompensierten metabolischen Alkalose (Gong, Yu et al. 2014).

Um die Transportkapazitäten der KO-Maus noch weiter zu fordern und untersuchen zu können, wurde eine Niedrig-Na⁺-Diät (NND) gefüttert und erneut eine Analyse durchgeführt. Der Blutdruck der KO verringerte sich weiter und das Körpergewicht war erniedrigt. Zudem zeigte sich ein erhöhter Hämatokritwert. Die Plasmakonzentration von Aldosteron war in den KO erhöht. Dies zeigte laut Gong et al., dass die Salzresorption im distalen Nephron durch höhere Aldosteronkonzentration kompensiert werden musste (zur Aldosteronwirkung siehe 1.5.2) (Gong, Yu et al. 2014).

Dankenswerterweise stand diese Maus auch für die Versuche in dieser Arbeit zur Verfügung. Die phänotypischen Veränderungen zeigen eine wichtige Rolle von Claudin-4 in der Salzresorption an. Die KO-Maus sollte in dieser Arbeit genutzt werden, um die Rolle von Claudin-4 in der parazellulären Salzresorption im CD elektrophysiologisch zu untersuchen.

1.6 Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es:

- die Eigenschaften des parazellulären Weges im CD der Maus zu beschreiben und zu charakterisieren.
- die Beteiligung von Claudin-4 an diesem Transportweg aufzuklären.
- eventuelle Regulationsmechanismen aufzuzeigen.

Dazu stand die bereits beschriebene KO-Maus (2.1.3) zur Verfügung. Die Untersuchungen sollten am nativen CD durchgeführt werden und hierzu sollte die elektrophysiologische Messung parazellulärer Eigenschaften im CD etabliert und optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle für die Lösungen verwendeten Chemikalien entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad und wurden, falls nicht anders erwähnt, über folgende Firmen bezogen: Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) und Roche Diagnostics GmbH (Mannheim). Die Chemikalien wurden mittels Feinwaage (Modell Vicon, Acculab, Massachusetts, USA) abgewogen. Zum Lösen der festen Chemikalien in Lösung wurde ein Magnetrührer (RCT basic, IKA®-Werke GmbH, Staufen) verwendet.

2.1.2 Lösungen

2.1.2.1 Perfusionslösungen

Für alle Lösungen wurde Aqua dest. als Lösungsmittel verwendet. Der pH-Wert der Lösungen wurde mittels Präzisions-pH-Meter (Knick Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin) gemessen und mit NaOH oder HCl auf 7,4 eingestellt.

Kontrolllösung (Standard)		
Stoff	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,44	145
KH ₂ PO ₄	136,09	0,4
K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	228,23	1,6
Glucose	180,16	5
MgCl ₂ * 6H ₂ O	203,3	1
Ca-Gluconat * 1H ₂ O	448,4	1,3

Tabelle 2: Kontrolllösung

30-Na ⁺ Cl ⁻ -Lösung		
Stoff	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,44	30
KH ₂ PO ₄	136,09	0,4
K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O	228,23	1,6
Glucose	180,16	5
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	203,3	1
Mannitol	182,17	230
Ca-Gluconat * 1 H ₂ O	448,4	1,3

Tabelle 3: 30-Na⁺Cl⁻-Lösung

Kontrolllösung (MgSO ₄)		
Stoff	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,44	145
KH ₂ PO ₄	136,09	0,4
K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	228,23	1,6
Glucose	180,16	5
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	246,48	1
Ca-Gluconat * 1H ₂ O	448,4	1,3

Tabelle 4: Kontrolllösung MgSO₄

Niedrig-Cl ⁻ -Lösung		
Stoff	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,44	5
KH ₂ PO ₄	136,09	0,4
K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O	228,23	1,6
Glucose	180,16	5
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	246,48	1
Na-Gluconat	218,13	140
Ca-Gluconat * 1 H ₂ O	448,4	8

Tabelle 5: Niedrig-Cl⁻-Inkubationslösung

2.1.2.2 Weitere Lösungen

Basislösung		
Stoff	Molmasse [g/mol]	Konzentration [mmol/l]
NaCl	58,44	140
KH ₂ PO ₄	136,09	0,4
K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O	228,23	1,6
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	246,48	1
Na-Aacetat * 3 H ₂ O	136,08	10
α-Ketoglutarat (K-1750)	146,1	1
Ca-Gluconat * 1 H ₂ O	448,4	1,3

Tabelle 6: Basislösung

Inkubationslösung	
Stoff	Menge (mg/100 ml)
Basislösung 100 ml	
Glycin	37,5
Trypsin Inhibitor	4,8
DNAse I	2,5

Tabelle 7: Inkubationslösung

Sortierlösung	
Stoff	Menge (mg/100 ml)
Inkubationslösung 100 ml	
Albumin (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)	50

Tabelle 8: Sortierlösung

Sowohl die Inkubationslösung als auch die Sortierlösung wurden steril filtriert (Filtropur S 0,2 Sarstedt, Nümbrecht) verwendet. Die Osmolalität wurde gemessen (Micro-Osmometer Model 210, Fiske Associates Inc., MA, USA) und es wurde stets eine plasmaisotone Osmolalität von 285-295 mosm/kg angestrebt und wenn nötig durch Zugabe von Mannitol erreicht.

2.1.3 Versuchstiere

Sämtliche Versuche wurden an Maus-Nieren durchgeführt. Als Versuchstiere dienten zwischen acht und dreizehn Wochen alte Mäuse, von denen einige einen CD-spezifischen Claudin-4-KO hatten. Dies bedeutet, dass sie in bestimmten Zellen, hier den PC des CD, keine Expression von Claudin-4 zeigten (siehe auch 1.5.5).

Dankenswerterweise wurden die Mauslinien von unserem Kooperationspartner Professor J. Hou (Washington University, Division of Biology and Biomedical Sciences, St. Louis, USA) generiert und zur Verfügung gestellt (Gong, Yu et al. 2014).

Es wurde das Rekombinationssystem Cre/loxP verwendet. Exon 1, das einzige Exon von Claudin-4, wurde dabei mit loxP-Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase aus Bacteriophagen versehen. Tiere mit auf diese Weise „gefloxtem“ Claudin-4 (*Cldn4 fl/fl*) dienten als Kontrolltiere (KT). CD-spezifische KO-Mäuse entstanden durch Kreuzung mit einer AQP 2-Cre-Mauslinie (The Jackson Laboratory, USA), d. h. einer Maus, die auf einem Allel die Cre-Rekombinase mit endogenen Promotoren und Enhancern des AQP 2 Gen exprimiert. AQP 2 wird in der Niere nur in den Hauptzellen des CD exprimiert, so dass die Gewebespezifität gewährleistet war. Ein KT-Weibchen wurde mit einem KO-Männchen verpaart (Kreuzungsschema Abbildung 7), um in der Tochtergeneration nach Mendel im Schnitt gleich viele KO- und KT-Tiere zu generieren.

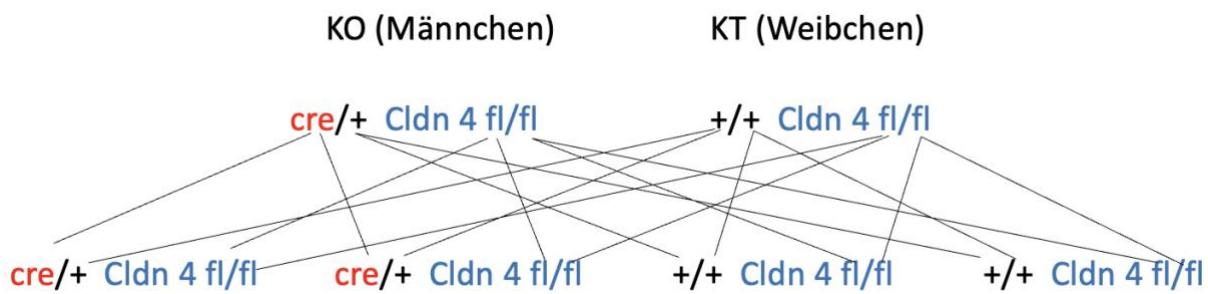


Abbildung 7: Kreuzungsschema Kontroll-Weibchen und Claudin-4 defizientes Männchen
KO: Claudin-4-Defizienz, KT: Kontrolle

Die Tiere wurden in isoliert-ventilierten Käfigen im Victor-Hensen-Tierhaus der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter und wurden unter einem zwölfstündigen Tag-Nachtzyklus gehalten.

Eine Genehmigung zur Zucht, Haltung und Durchführung der Versuche lag vor. Alle Experimente wurden nach deutschem Recht und mit Genehmigung des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein sowie unter ständiger Beratung und Kontrolle des Tierschutzbeauftragten der Universität Kiel durchgeführt (siehe 7.1).

2.1.4 Diäten

Neben üblichen Standarddiäten für Mauszuchten erhielten einige Tiere über sieben bis neun Tage NND (Tabelle 9). Der Na⁺-Anteil lag bei weniger als 0,03 % (Standard 0,19 %) bei einem Cl⁻-Anteil von 0,18 %. Die beiden verschiedenen Diäten werden im Folgenden als Standard-Na⁺-Diät (SND) und Niedrig-Na⁺-Diät (NND) bezeichnet.

	Na ⁺	Cl ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Standard-Na ⁺ Diät	0,19%	0,19%	0,97%	0,9%	0,21%
Niedrig-Na ⁺ Diät	<0,03%	0,18%	0,97%	0,9%	0,21%

Tabelle 9: Ionengehalt der der Diäten zur Mauszucht

Die Niedrig-Na⁺-Diät (NND) enthielt deutlich weniger Na⁺. Alle anderen für die Experimente relevanten Ionen waren in beiden Diäten in ähnlicher Menge vorhanden. Die Produkte wurden bezogen über: ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest.

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung

Allen Mäusen wurden wenige Tage nach Geburt eine Gewebeprobe (Schwanzende und Ohrlöcher) entnommen, um eine Genotypisierung vorzunehmen und somit zu bestimmen, ob es sich um eine KO- oder KT-Maus handelt. Zusätzlich wurden von allen Tieren im Experiment eine Gewebeprobe (Schwanzstück) bei -80°C asserviert. Alle Daten wurden durch eine weitere Genotypbestimmung bei den entsprechenden Mäusen abgesichert. Die Genotypisierung erfolgte mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

2.2.1.1 Isolation der DNA

Die Gewebeprobe wurde mit 500 µl Lysispuffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 50 µl Sodiumdodecylsulfat-Lösung (SDS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und 50

μ l Proteinase K (20 mg/ml) (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) versetzt und über Nacht im Thermoshaker (eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf) bei 56 °C und 350 U/min inkubiert.

Anschließend wurde die Probe für fünf Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert (Zentrifugen Modell Multifuge und Biofuge (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)) und der Überstand in einem 1:1 Verhältnis mit 100 % Ethanol suspendiert, um die DNA zu fällen. Es folgte die erneute Zentrifugation, das Abpipettieren und Verwerfen des Überstandes. Die DNA haftete nun am Rand des Reaktionsgefäßes. Die DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und mit DNase-freiem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2 PCR

Die PCR ist eine Methode, um DNA *in-vitro* zu vervielfältigen. Dabei wurde mit Hilfe zweier Primer (oIMR7130: CTCTGCAGGAACTGGTGCTGG, oIMR7131: GCGAACATCTTCAGGTTCTGC GG, Eurofins genomics Germany GmbH, Ebersberg) eine Sequenz repliziert, die spezifisch für die Cre-Rekombinase war, d. h. es entstand nur bei KO-Mäusen ein PCR-Produkt, da KT zwar Cldn4 fl/fl für die Cre-Rekombinase negativ waren (siehe 2.1.3).

Für die PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

Substanz	Menge pro Probe (in μ l)
DreamTaq Puffer (MBI Fermentas Inc., Harrington, USA)	3
dNTP 10 mM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)	2,4
DreamTaq 5U/ μ l (MBI Fermentas Inc., Harrington, USA)	0,15
Primer 7130 1:10 (100 pg/ μ l, Eurofins genomics Germany GmbH, Ebersberg)	0,625
Primer 7131 1:10 (100 pg/ μ l, Eurofins genomics Germany GmbH, Ebersberg)	0,625
Dimethylsulfoxid (DMSO) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)	0,325
MgCl ₂ 25 mM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)	0,6
Nukleasefreies H ₂ O (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)	18,73

Tabelle 10: Ansatz der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Anschließend wurden 2 μ l der Probe (vgl. 2.2.1.1) mit 23 μ l des Ansatzes zusammengefügt, gemischt, zentrifugiert und in das *Eppendorf Mastercycler epgradient-S-PCR-Gerät* (eppendorf AG, 50389 Wesseling-Berzdorf) geladen.

Für die PCR wurde folgendes Schema genutzt:

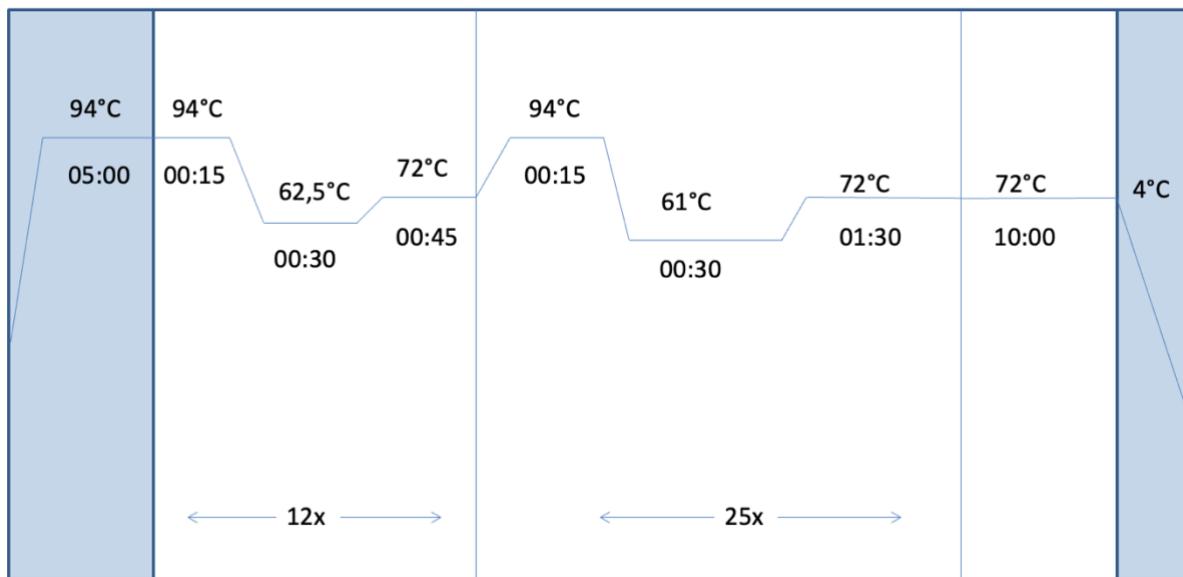


Abbildung 8: Schema der Genotypisierungs Polymerase-Ketten-Reaktion

Temperatur in °C sowie Dauer der einzelnen Phasen in Minuten angegeben, unten: Anzahl der Wiederholungszyklen

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese. Es wurden Gele, bestehend aus 1,8 g Agar (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe), 100 ml TRIS-Borat-EDTA-Puffer und 5 μ l *SYBR DNA gel stain* (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), verwendet. Die Probe nach PCR wurde mit jeweils 5 μ l Loading-Buffer (Promega GmbH, Walldorf) beladen und in die Taschen im Gel gefüllt. Parallel wurde ein PCR Marker aufgetragen (PCR Markers, Promega GmbH, Walldorf). Anschließend erfolgte die elektrische Auftrennung über 50 min mit 120 V (Spannungsquelle Consort E835 – Consort, Turnhout, Belgium) in einer Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN II, Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen)

Die Auswertung der Gelelektrophorese erfolgte optisch unter UV-Licht und mit Bilddokumentation. Bei KO erschien eine Bande, die 673 Basenpaare (bp) groß war (Abbildung 9).

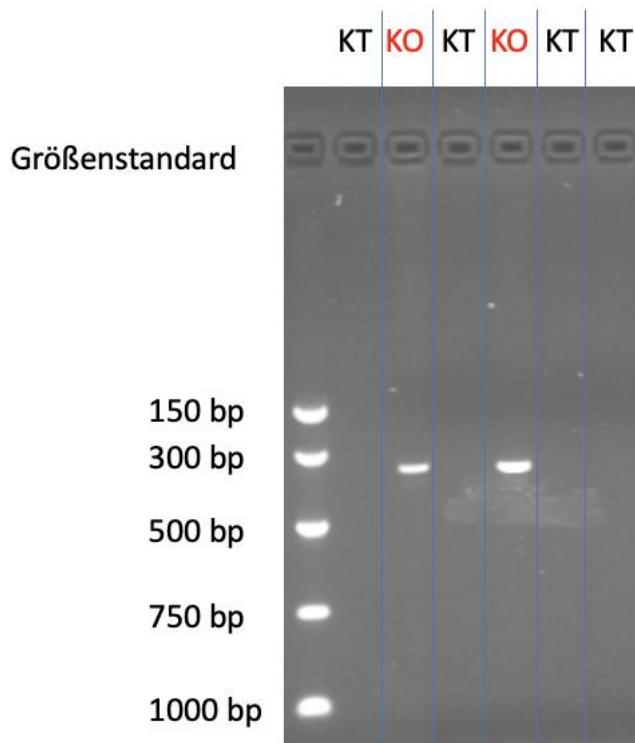


Abbildung 9: Gel nach PCR zur Genotypisierung

Es wurden sechs Proben und ein Größenstandard (links) aufgetragen. Die beiden Proben aus KO-Mäusen zeigen eine Bande zwischen 750 bp und 500 bp. Das Produkt soll theoretisch 673 bp groß sein.

2.2.2 Gewinnung von kortikalen Sammelrohren (cCD)

2.2.2.1 Euthanasie und Entnahme der Nieren

Zur finalen Narkotisierung wurden die Mäuse in eine Narkosekammer gesetzt. Über eine Gasmischeinheit (Drägerwerk AG & Co. KGaA, Moislinger Allee 53-55, 23558 Lübeck) wurde die Zuluft mit 5 % Isofluran (Forene® – Abbott GmbH, Wiesbaden) versetzt. Nach sicherem Eintreten der Narkose erfolgte die zügige Dekapitation der Maus.

Anschließend wurde das Abdomen mit einem medianen Schnitt eröffnet. Die Präparation der Nieren im retroperitonealen Fettgewebe erfolgte stumpf mittels zweier Pinzetten. Nachdem die Gefäßzugänge getrennt wurden, konnten die Nieren entnommen werden. Die Nieren wurden dekapsuliert und in koronarer Schnittführung mit einer Skalpellklinge #21 (C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen) in maximal 0,5 mm dünne Scheiben geschnitten.

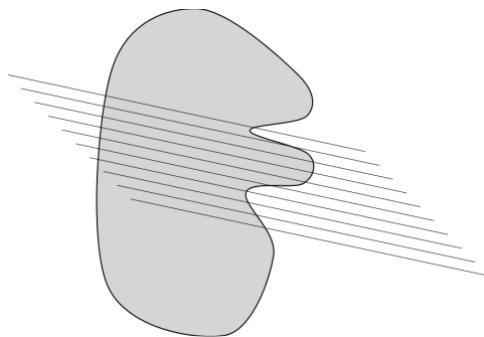


Abbildung 10: Grafik einer rechten Niere (anteriore Ansicht)

Eingezeichnet ist die Schnittführung - es entstehen bis zu maximal 0,5 mm dicke Nierenscheiben, die dann in Sortierlösung auf Eis aufbewahrt wurden. Die Pole der Nieren wurden verworfen, da dort bei eingezeichneter Schnittführung nur sehr kurze Tubuli entstanden.

2.2.2.2 Manuelle Isolation von Sammelrohren (cCD)

Für die manuelle Isolation von cCD wurden die Nierenscheiben in Sortierlösung auf Eis aufbewahrt. Um eine Aggregation und Anhaftung von cCD an Behältnissen und Pipetten zu verhindern, enthielt die Sortierlösung 50 mg Albumin/100 ml (vgl. Tabelle 8). Lagerung und Nutzung der Nieren für Experimente überschritten 120 min ab dem Todeszeitpunkt der Maus nicht.

Zur Dissektion wurde eine Nierenscheibe in eine mit Sortierlösung gefüllte Kulturschale überführt und unter Wasserkühlung (4 °C) mit einem Stereomikroskop (MZ16 Stereomikroskop, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) betrachtet. Mit zwei feinen Dissektionspinzetten (Dumont #5, Manufactures D’Outils Dumont SA, Schweiz) wurden aus den Nierenscheiben Bündel von Nierentubuli entnommen. Für die cCD-Präparation handelte es sich dabei um Markstrahlbündel. Nach und nach wurden alle anhaftenden nicht benötigten Nierentubuli entfernt, sodass ein einzelnes cCD isoliert werden konnte. Die Unterscheidung der verschiedenen Nierentubuli erfolgte anhand histomorphologischer Kriterien. Für die Perfusion wurden cCD ausschließlich aus dem Kortex der Nieren isoliert.

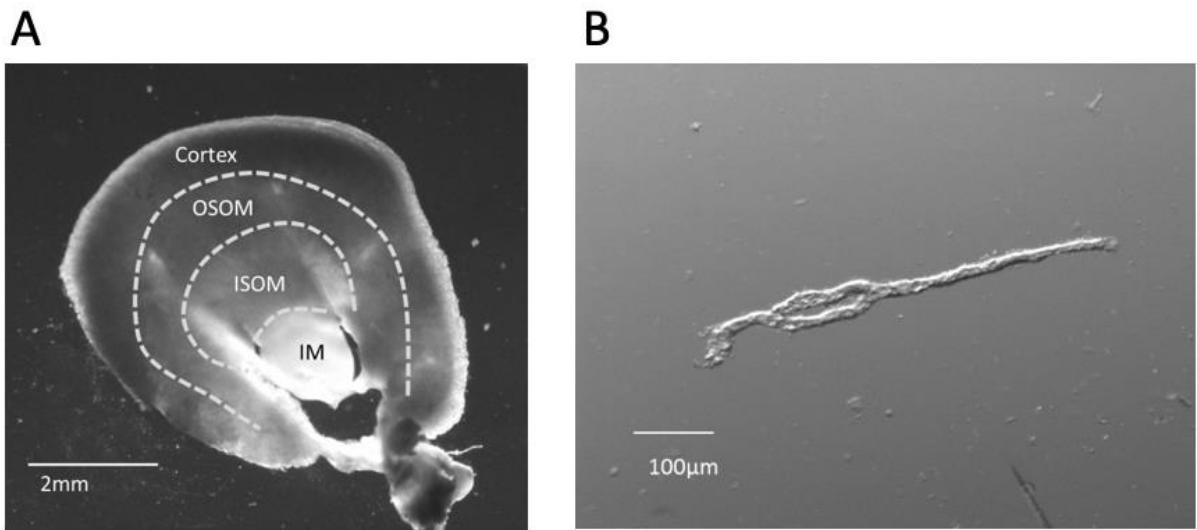


Abbildung 11: Nierenscheibe (A) und kortikales Sammelrohr (cCD) (B)

Mikroskopische Betrachtung A: IM= Inneres Mark, ISOM=Innerer Streifen des äußeren Markes, OSOM= Äußerer Streifen des äußeren Markes, Cortex= Nierenrinde, Dissektion von Tubulus-Bündeln aus diesen Scheiben, B: cCD manuell dissiziert, ca. 600 µm lang. Vor der Verzweigung wäre es möglich, dass cCD zu kürzen, um es anschließend zu perfundieren.

2.2.3 *In-vitro* Tubulusperfusion

Die *in-vitro* Tubulusperfusion ist eine Technik, um frisch entnommene Nierentubuli mit verschiedenen Salzlösungen (vgl. 2.1.2.1) zu perfundieren. Mit Hilfe dieser Technik können elektrophysiologische Eigenschaften gemessen und epitheliale Transportprozesse in den jeweiligen Abschnitten der Niere untersucht werden.

2.2.3.1 Perfusionssystem

Das Perfusionssystem wurde nach dem von Professor Greger beschriebenen System modifiziert (Greger and Hampel 1981). Die Perfusion von cCD unterscheidet sich von der Perfusion anderer Nierentubuli, weshalb es nötig war, einige Anpassungen am Mikroperfusionssystem vorzunehmen. In Abbildung 12 ist das Schema eines Perfusionssystems gezeigt. Es bestand aus vier ineinander gelagerten Glaspipetten. In die Konstriktionspipette wurde das cCD eingespannt, weshalb der innere Durchmesser an der Engstelle dieser Pipette etwas kleiner war als der äußere Durchmesser eines cCD. Er betrug circa 20-22 µm (Abbildung 12). Die Pipette wurde vor den Experimenten mit Kontrolllösung gefüllt und konnte manuell über eine Glasspritze und ein Schlauchsystem druckreguliert werden. Somit konnten die Enden der cCD in die Pipette eingezogen und gehalten werden. Um den Anfang der cCD abzudichten, wurde außen eine weitere größere Pipette aus etwas dickerem Glas (Sylgaardpipette) installiert und mit Sylgaard-Silikonöl (Viskosität: 1000 mm²/s

(cSt), BSR-Line, Deutschland) gefüllt. Nach Einspannen eines CD konnte so ein abdichtender Ölfilm über die Schnittstelle von CD und Konstriktionspipette gefahren werden. In Vorversuchen zeichnete sich ab, dass Silikonöl mit einer Viskosität von $1000 \text{ mm}^2/\text{s}$ (cSt) statt $5000 \text{ mm}^2/\text{s}$ (cSt) geeigneter war, um das CD abzudichten. Durch seine geringere Viskosität floss das Öl bei Vorschub der Sylgaardpipette von selbst über die Schnittstelle von CD und Konstriktionspipette. Dies ersparte eine Druckmanipulation des Silikonöls und ggf. eine mechanische Irritation des perfundierten CD. So war es möglich, eine größere Zahl von cCD bei guten abdichtenden und isolierenden Eigenschaften zu erzielen.

Innen lag die doppelläufige Mikroperfusionspipette. Die beiden unabhängigen Lumina dienten der Messung der elektrischen Spannung und der Injektion eines Strompulses zur Widerstandsmessung. Darüber hinaus konnten direkt nacheinander zwei verschiedene Salzlösungen in das Innere des cCD perfundiert werden. Dazu wurde in einen Schenkel der Perfusionspipette eine weitere kleinere Flüssigkeitsaustauschpipette vorgeschoben, um direkt an der Spitze andere Salzlösungen einbringen zu können. In den anderen Schenkel der Perfusionspipette wurden zwei sehr feine Polyethylenschlüsse (neoLab, Heidelberg) für Zu- und Ablauf der Salzlösungen in diesem Schenkel sowie ein Silberdraht vorgeschoben. Über diesen Draht wurden Strompulse aus einem Pulsgenerator (Elektronikwerkstatt des Physiologischen Institutes, CAU Kiel) über die Perfusionspipette in das CD-Lumen appliziert. Zudem wurde über eine 1 M KCl/Agar-Brücke eine Messelektrode angeschlossen, die elektrisch mit dem CD-Lumen verbunden war. Ein Druckgeber, der in der institutseigenen Werkstatt hergestellt wurde, erlaubte es Drücke von $300\text{-}1000 \text{ mmH}_2\text{O}$ auf die Flüssigkeitsaustauschpipette sowie den Zulauf des anderen Schenkels zu auszuüben. Somit konnte kontinuierlich Flüssigkeit mit einem konstanten Druck perfundiert werden. Die Enden der Pipetten wurden mit einem Glasschneidstift (Schreibdiamant mit Holzgriff, neoLab Migge GmbH, Heidelberg) zugeschnitten und mit Haftvermittler (Heliobond, Ivoclar vivadent GmbH, Ellwangen) abgedichtet, um einen Druckverlust an der dem cCD abgewandten Seite zu verhindern.

Die Gegenseite bzw. das Ende des CD wurde durch eine weitere Glaspipette gehalten, wobei das CD dabei nicht geschlossen wurde, sondern offen in der Halteseite mündete. Damit wurde eine elektrische Isolation des offenen Sammlrohrendes erreicht.

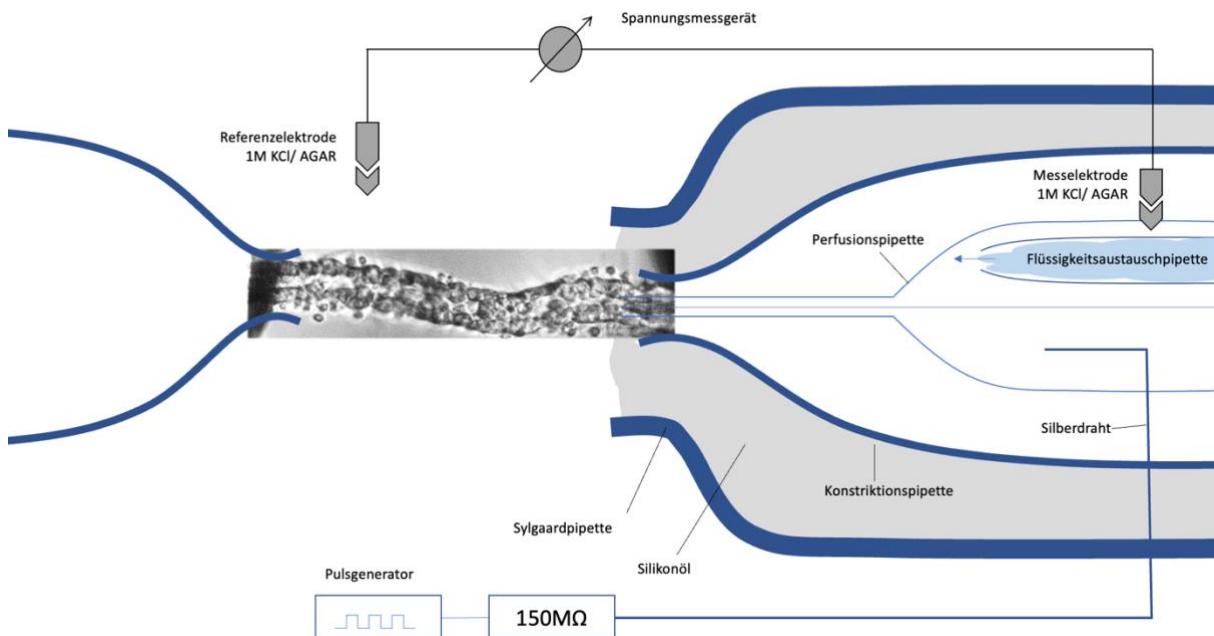


Abbildung 12: Schema des Perfusionssystems

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des verwendeten Perfusionssystems, ein Foto des Perfusionsarbeitsplatzes ist in Abbildung 14 dargestellt. Auf der rechten Seite ist das Perfusionssystem zu erkennen. Außen ist die mit Silikonöl (grau) gefüllte Sylgaardpipette, welche den eingespannten Anfang des Sammelrohres (CD) abdichtet und elektrisch isoliert. Die Konstriktionspipette hält das CD durch geringen Unterdruck fest. Die doppelumige Perfusionsspipette in der Mitte wurde zur Perfusion in das CD vorgeschoben. Über den Silberdraht im ersten Schenkel wurden die elektrischen Pulse eingeleitet. Über die Flüssigkeitsaustauschpipette im zweiten Schenkel der Perfusionsspipette konnten luminal noch andere Flüssigkeiten appliziert werden. Hier wurde zu Anfang der Experimente Kontrolllösung und später mit Amilorid und Hydrochlorothiazid (HCT) versetzte Kontrolllösung perfundiert. Oben im Bild ist ein Spannungsmessgerät dargestellt, das die transepitheliale Spannung (V_{te}) über den zweiten Schenkel der Perfusionsspipette im Bezug zum basolateralen Bad misst. Auf der linken Seite ist die Haltepipette dargestellt, ebenfalls eine Pipette mit Konstruktion (zur Herstellung der Pipetten siehe Abbildung 13), um das CD am Ende zu stabilisieren bzw. zu halten und ihn so elektrisch zu isolieren. Das offene Ende erlaubt die kontinuierliche Perfusion auch innerhalb der Haltepipette, die zu diesem Zweck einen deutlich größeren Innendurchmesser als die Konstriktionspipette aufwies. In der Mitte ist ein Foto eines CD während der Perfusion gezeigt. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu.

Alle beschriebenen Pipetten wurden aus Glaskapillaren (Borosilikatglas, Sylgard aus Sodaglas, Hilgenberg GmbH, Malsfeld) an einer Mikroschmiede (Werkstatt MPI für Biophysik, Frankfurt) geformt. Die Kapillaren wurden dazu mit einem Silber- oder Platindraht unter Rotation seitlich erhitzt und durch ein kleines vorher angebrachtes Gewicht mit der Schwerkraft ausgezogen, bis sie die gewünschten Durchmesser und Längen erreichten. In Abbildung 13 ist beispielhaft gezeigt, wie bei der Konstriktionspipette nach Ausziehen und Schmieden einer dünnen Spitze schließlich eine Verengung (Konstruktion) hergestellt wurde.

Anschließend wurden die Pipetten in der nach unten geneigten Pipettenhalterung ineinandergeschoben und befestigt. Über seitlich angebrachte Schrauben konnten die Pipetten zueinander zentriert werden.

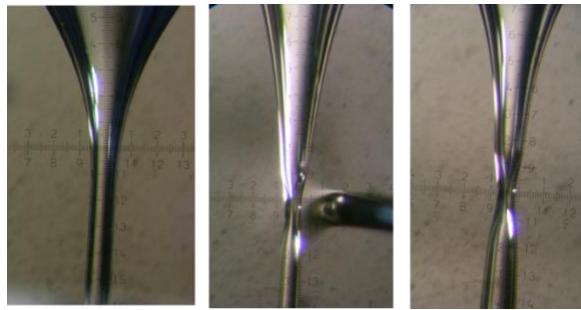


Abbildung 13: Bearbeitung der Konstriktionspipette

Von links: Eine schon gezogene und dadurch verjüngte Pipette wird nach Entfernen der Zuglast mit Hilfe eines Platindrahtes erhitzt (Mitte) und zieht sich an dieser Stelle zusammen. So kann ein benötigter Innendurchmesser von 10-24 µm erzeugt werden.

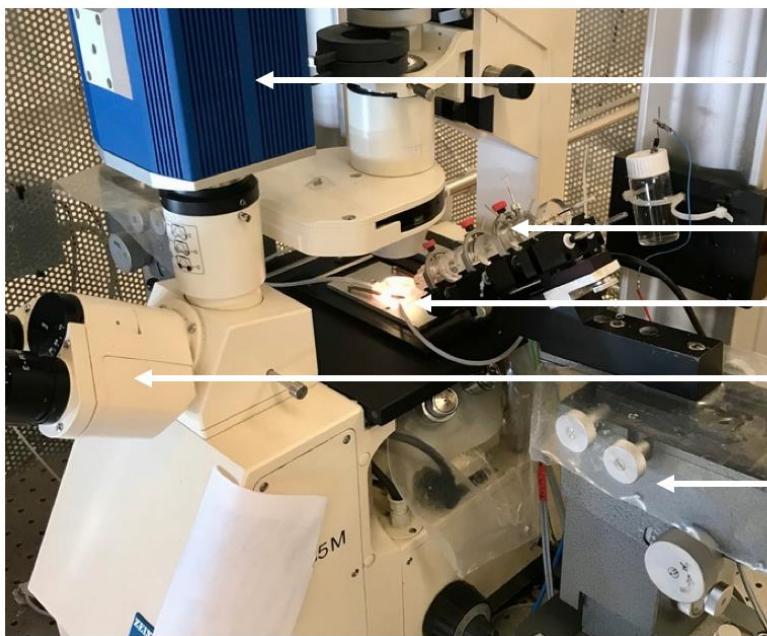
Das Perfusionssystem wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) rechts neben einem invers eingebauten Mikroskop (Axiovert 10 - Carl Zeiss, Jena) angebracht (Abbildung 14). Spiegelbildlich wurde ein ähnliches System mit nur einer Konstriktionspipette als Haltepipette angebracht. In den Mikroskoptisch konnte ein auf 37 °C beheiztes Bad eingebracht werden, welches über einen Zulauf und einen Ablauf verfügte, um es mit frischer Perfusionslösung zu füllen (Abbildung 14). Die Spitzen der Pipetten reichten bis in die Lösung, in der sich auch das CD zur Perfusion befand. So war es möglich, ein basolaterales Kompartiment im Bad sowie ein luminales im Inneren des CD getrennt voneinander mit verschiedenen Lösungen zu perfundieren. Der gesamte Arbeitsplatz war durch einen Faraday'schen Käfig (Eigenbau Mechanikwerkstatt, Physiologisches Institut, CAU Kiel) elektrisch abgeschirmt (Abbildung 14).



Faraday'sche Abschirmung

Perfusionssystem

Stereomikroskop



Kamera, an Mikroskop angeschlossen

Perfusionssystem

Perfusionsbad mit Zu- und Ablauf

Stereomikroskop

Mikromanipulator

Abbildung 14: Perfusionsarbeitsplatz

Auf den beiden Fotos ist der Perfusionsarbeitsplatz gezeigt. Oben ist die Übersicht, unten ist eine etwas vergrößerte Ansicht gezeigt. In der Mitte ist das Perfusionsbad mit den Schläuchen für eine konstante Badperfusion erkennbar. Rechts davon ist das Perfusionssystem auf einem Mikromanipulator montiert. Die Haltepipette ragt von der linken Seite in das Bad und ist hier nicht zu erkennen (verdeckt). Ein Stereomikroskop mit angeschlossener Kamera vervollständigt das Setup und ermöglicht die kontrollierte Arbeit am Perfusionsplatz.

2.2.4 Elektrophysiologie der Messungen am Perfusionsarbeitsplatz

Mit dem Perfusionssystem (schematische Darstellung siehe Abbildung 12, Foto des Perfusionsarbeitsplatzes Abbildung 14) war es möglich, elektrophysiologische Eigenschaften des CD zu messen. Zur besseren Darstellung wurde eine Messverstärker verwendet (FD223, World Precision Instruments GmbH, Friedberg). Ein Schenkel der Perfusionspipette war dafür über eine Agarbrücke (1 M KCL, 2,5 % Agar) an eine Ag/AgCl-Pellet-Elektrode (*RC-3- World Precision Instruments, USA*) angeschlossen. Als Referenz diente eine weitere Elektrode, welche im basolateralen Bad angebracht war und ebenfalls über eine Agarbrücke mit einer Ag/AgCl-Pellet-Elektrode verbunden war. Beide Elektroden waren über einen Verstärker an einen analogen Schreiber (Flatbed Recorder Type BD12, Kipp & Zonen B.V. - Delft, Niederlande) angeschlossen, der die Spannung auf Papier aufzeichnete.

Über den zweiten Schenkel der Perfusionspipette wurden Strompulse von 13 nA in das CD-Lumen geleitet (Spannungspuls von 6,5 V bei $500\text{ M}\Omega$ Vorwiderstand) (Abbildung 12). Unter Berücksichtigung der Leitfähigkeit der Lösung, des Durchmessers sowie der Länge des CD konnte damit der R_{te} mit Hilfe der Kabelgleichung (*constant field equation*) berechnet werden (Greger 1981).

Bei asymmetrischen Lösungen (luminal Kontrolllösung, basolateral 30-NaCl-Lösung) wurden die gemessenen Spannungen um das *Liquid-junction-Potenzial* der verschiedenen Elektrolytlösungen korrigiert. Dieses elektrische Potenzial entsteht, wenn zwei Lösungen mit unterschiedlichen Elektrolytzusammensetzungen aufeinandertreffen (Barry and Lynch 1991, Ng and Barry 1995).

Die Länge und der innere Durchmesser der Tubuli wurden anhand von Fotos der Tubuli ermittelt, die während der Experimente aufgenommen wurden. Dazu wurden die Programme *MetaFluor* (Molecular Devices GmbH, Bismarckring 39, 88400 Biberach an der Riß), sowie *Image J* (Wayne Rasband, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA) genutzt.

2.2.4.1 Berechnungsgrundlage der elektrophysiologischen Eigenschaften

Die Messung der transepithelialen Spannung (V_{te} , *transepithelial voltage*) erfolgte kontinuierlich während des Experiments. Die Systemnull wurde vor und nach der Messung

ohne eingespanntes CD erhoben. So konnte ggf. eine leichte durch die Agar-Brücken bedingte Drift der Nulllinie ausgeglichen werden.

2.2.4.1.1 Transepithelialer Widerstand

Für die Berechnung des R_{te} war es nötig, Strom wie beschrieben zu injizieren. Dabei verhält sich ein CD ähnlich einem Axon beziehungsweise einem Kabel, an dem die Spannung mit der Länge abfällt. Die durch den Strompuls generierten Spannungsänderungen ΔV_{te} wurden um den Leerwert des Systems (ΔV_{te} ohne CD) korrigiert. Dazu wurde folgende Formel genutzt:

$$\Delta V_{te} = \Delta V_{te\text{ gesamt}} - \Delta V_{te\text{ Leerwert}}$$

Zur Berechnung von R_{te} wurde dann die Kabelgleichung genutzt (Greger 1981, Greger 1981, Greger and Hampel 1981).

$$R_{te} = 2 \sqrt{\pi \varrho \lambda^3 \frac{\Delta V_{te}}{I_o} \tanh\left(\frac{L}{\lambda}\right)}$$

Dabei steht ϱ für den spezifischen Widerstand der Perfusionslösung. L beschreibt die Länge des CD. λ beschreibt die Tubuluslängskonstante (hier: CD-Längskonstante), welche aus folgender Formel hervorgeht:

$$\lambda = \frac{\Delta V_{te} \pi r_m^2}{I_o \varrho}$$

Hier steht r für den inneren Radius des CD.

2.2.4.1.2 Äquivalenter Kurzschlussstrom

Der äquivalente Kurzschlussstrom (I'_{sc}) ist ein Indikator für den transepithelialen Transport. Er ist äquivalent zu dem maximalen Strom unter Kurzschlussbedingungen (Spannung auf 0 V geklemmt), wird jedoch aus V_{te} und R_{te} mit Hilfe des „Ohmschen Gesetzes“ berechnet.

$$I'_{sc} = \frac{V_{te}}{R_{te}}$$

2.2.4.1.3 Na^+ - Cl^- -Permeabilitätsverhältnis

Das Verhältnis von P_{Cl} und P_{Na} ($P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$) eines CD konnte mit Hilfe der Gleichung von Goldmann, Hodgkin und Katz aus einem Diffusionspotenzial (DP) berechnet werden. (Goldman 1943)

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^n P_{C_i} [C^+]_{out} + \sum_{j=1}^m P_{A_j} [A^-]_{in}}{\sum_{i=1}^n P_{C_i} [C^+]_{in} + \sum_{j=1}^m P_{A_j} [A^-]_{out}} \right); \quad E_m = E_{in} - E_{out}$$

Hier beschreibt E_m das Gleichgewichtspotenzial aus ein- und auswärts gerichtetem Potenzial (E_{in} und E_{out}) bei entsprechenden Konzentrationen verschiedener Kationen [C^+] und Anionen [A^-]. R ist die allgemeine Gaskonstante, F die Faraday-Konstante und T die absolute Temperatur (in Kelvin). Die Konzentrationsunterschiede für die Entstehung eines DP wurden durch Austausch der Badlösung gegen isoosmotische 30-NaCl-Lösung erzeugt (siehe 2.2.4.2.1). Zuvor wurde der transepitheliale Transport durch Amilorid (Sanofi-Aventis, Deutschland GmbH, Frankfurt) und HCT (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) geblockt. Dadurch spielten in diesem Fall nur die parazellulären Eigenschaften für die Ionen Na^+ sowie Cl^- eine wesentliche Rolle. Die Formel kann dann wie folgt vereinfacht werden:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{\text{Na}}[\text{Na}^+]_{bl} + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}^-]_{ap}}{P_{\text{Na}}[\text{Na}^+]_{ap} + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}^-]_{bl}} \right)$$

Da der transzelluläre Transport, wie bereits erwähnt, gehemmt wurde, entspricht das transepitheliale Potenzial unter diesen Bedingungen dem DP.

2.2.4.1.4 Absolute Permeabilitäten

Es ist auch möglich, die absoluten parazellulären Permeabilitäten für Ionen zu berechnen. Dazu wurde eine vereinfachte „Kimizuka-Koketsu Gleichung“ verwendet (Van Itallie, Rahner et al. 2001, Gunzel and Yu 2009, Plain Reyes 2015) unter der Einbeziehung von R_{te} unter Amilorid und HCT bzw. dem entsprechenden Leitwert G_r :

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

Die absolute P_{Cl} konnte berechnet werden, indem man das Ergebnis der P_{Na} mit dem Kehrwert des $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ multiplizierte.

$$P_{Cl} = P_{Na} \left(\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} \right)^{-1}$$

2.2.4.2 Messprotokolle

Alle Experimente wurden nach einem zu Anfang festgelegten Protokoll durchgeführt. In Vorversuchen wurden die Protokolle etabliert. Dabei wurde auf Durchführbarkeit, Realitätsnähe und hohe Qualität der Messungen Wert gelegt. Gemessen wurden die Länge des CD zu verschiedenen Messzeitpunkten, der innere Radius und ΔV_{te} für die Berechnung von R_{te} und I'_{sc} sowie das DP. Aus diesen Daten konnten alle anderen elektrophysiologischen Werte wie vorgehend beschrieben berechnet werden. Folgende Protokolle stellten sich dabei als für die Fragestellung passend und messtechnisch möglich heraus:

2.2.4.2.1 Messungen nach Gabe von Diäten

Das CD wurde in das System eingespannt und basolateral wie auch luminal mit Kontrolllösung perfundiert. In Abbildung 15 ist eine original Schreiberaufzeichnung gezeigt. Sobald sich ein stabiles V_{te} eingestellt hatte, wurde ein Foto des CD zur Messung von Länge und Innenradius gespeichert (Messzeitpunkt 1, Abbildung 15). Anschließend wurde luminal die Kontrolllösung durch 50 μ M Amilorid sowie 100 μ M HCT enthaltende Kontrolllösung ersetzt, die eine Hemmung der transepithelialen Transportprozesse bewirkte (Messzeitpunkt 2, Abbildung 15). Dann wurde die basolaterale Lösung durch die 30-NaCl-Lösung getauscht, wodurch das DP zustande kam (Messung (DP), Abbildung 15). Nach basolateralem Auswaschen der 30-NaCl-Lösung mit Kontrolllösung erfolgte die dritte Messung (Messzeitpunkt 3, Abbildung 15).

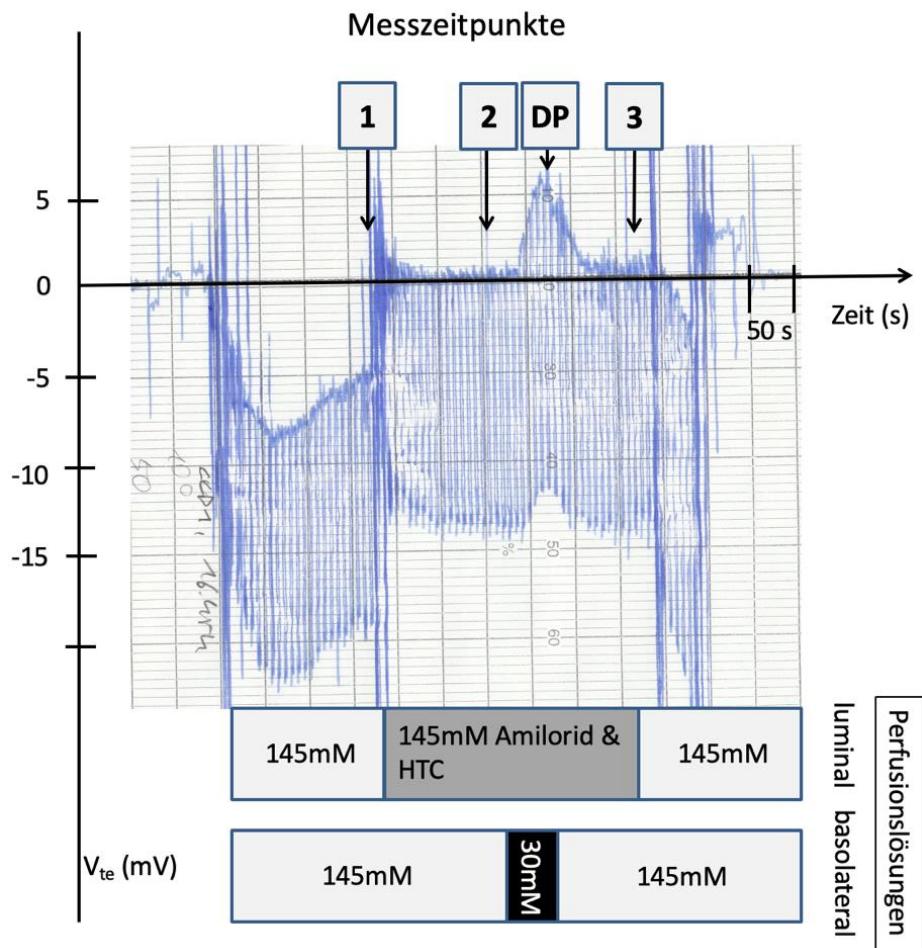


Abbildung 15: Originalexperiment (Kontrolle, Niedrig-Na⁺-Diät)

Transepitheliales Potenzial (V_{te}) in mV versus Zeit in s; das zunächst Lumen-negative Potenzial bricht bei luminaler Gabe von Amilorid und Hydrochlorothiazid (HCT) ein (1). Ein deutlich Lumen-positives Diffusionspotenzial (DP) entsteht unter 30-NaCl-Lösung basolateral. Die angegebenen Konzentrationen beschreiben den NaCl-Gehalt der Lösungen. Zu den Messzeitpunkten (1, 2, DP und 3) wurden Länge sowie Innenradius des CD fotografisch festgehalten.

2.2.4.2.2 Niedrig-Cl⁻-Inkubation

Für diese Versuchsreihe wurde die Kontrolllösung zur Cl⁻-Reduktion leicht modifiziert und Magnesiumsulfat ($MgSO_4$) statt Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) eingewogen. Da die Niedrig-Cl⁻-Lösung möglichst wenig Cl⁻ enthalten sollte, war dies nötig, um symmetrische Messbedingungen zu schaffen. Auch hier wurde nach kurzer Äquilibrierungsphase luminal eine mit 50 µM Amilorid versetzte $MgSO_4$ -Kontrolllösung perfundiert, um den ENaC zu hemmen. Danach folgte entweder Niedrig-Cl⁻-Lösung oder $MgSO_4$ -Kontrolllösung basolateral. Mit der jeweiligen Lösung wurde der CD für 15 Minuten inkubiert. Anschließend folgte eine fünfminütige Phase, in welcher $MgSO_4$ -Kontrolllösung basolateral appliziert wurde und somit die Lösung der Inkubationszeit ausgewaschen wurde. Schließlich wurde das DP mit der 30-

NaCl-Lösung erzeugt (Messung (DP), Abbildung 16). Zuletzt erfolgte eine Auswaschung mit MgSO₄-Kontrolllösung. In Abbildung 16 sind die Messzeitpunkte und das DP anhand einer originalen Schreiberaufzeichnung dargestellt.

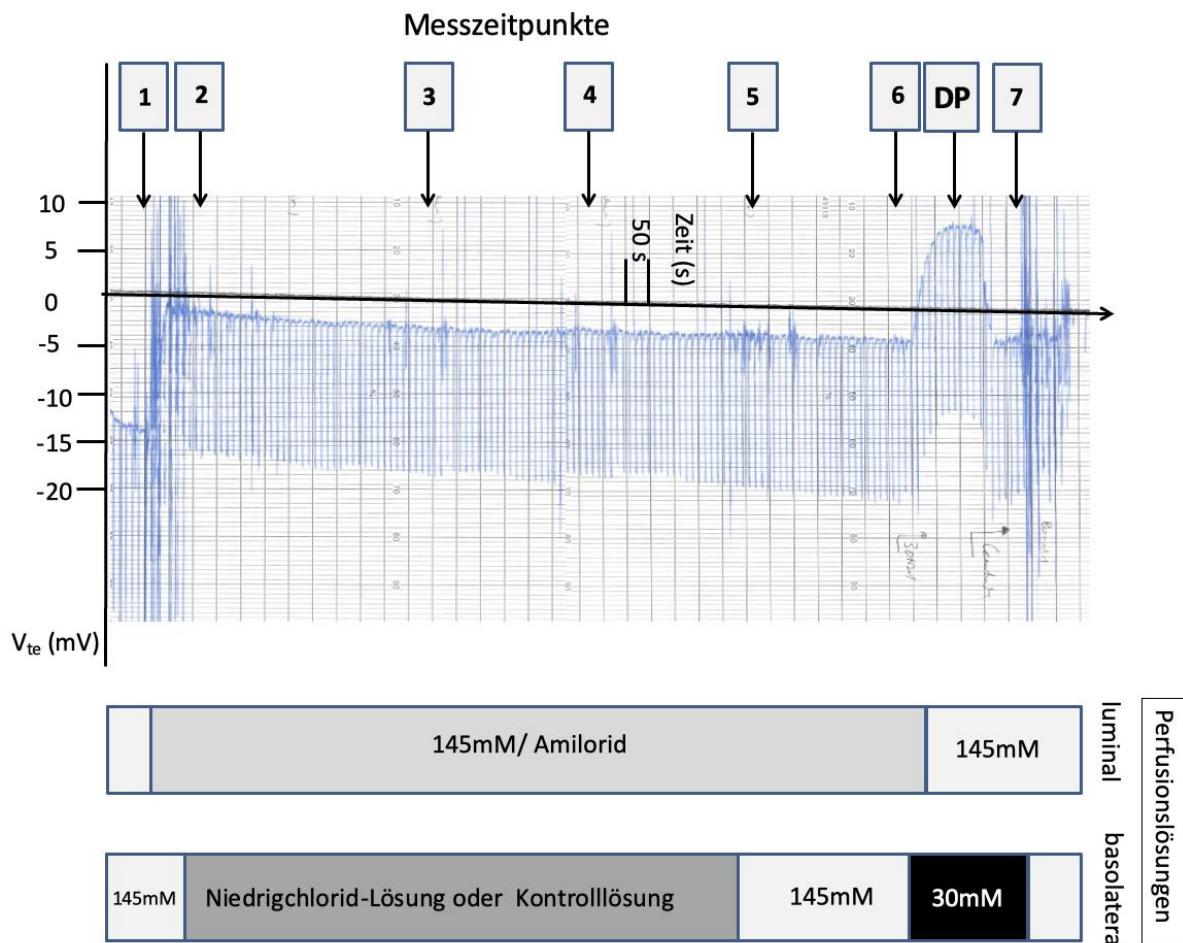


Abbildung 16: Originalexperiment der Cl-Inkubation (Kontrolle, Inkubation Kontrolllösung)

Transepitheliales Potenzial (V_{te}) in mV versus Zeit in s; die angegebenen Konzentrationen beschreiben den NaCl-Gehalt der Lösungen. Zu den Messzeitpunkten (1-7 und Diffusionspotenzial (DP)) wurden Länge sowie Innenradius des CD fotografisch festgehalten.

2.2.5 Datenanalyse

Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA) und GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA 92037 USA). Als Signifikanzniveau wurde ein $p<0,05$ festgelegt. Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ist als Fehlerindikator in die Diagramme eingefügt. Zum Vergleich von KO- und KT-Mäusen dienten der gepaarte, zweiseitige t-Test, beim Vergleich von mehreren Gruppen ein einseitiger ANOVA mit Tukey post-hoc-Test.

2.2.5.1 Ausschlusskriterien

Die cCD zeigten sich in der Perfusion als relativ fragil und anfällig. Im Gegensatz zu TAL, welche sich in der Perfusion als relativ robust zeigen, entstanden bei vielen cCD schon durch minimalste Manipulation, zum Beispiel mit den Dissektionspinzetten, kleine Leckagen, welche einen Kurzschluss zwischen Tubuluslumen und dem basolateralen Kompartiment zur Folge hatten. Diese waren an einem stark abfallenden bzw. von Beginn an sehr niedrigem R_{te} zu erkennen. Daher war es nötig, einen zu geringen R_{te} als Ausschlusskriterium für die Auswertung festzulegen, um keine falsch niedrigen Widerstände in der Auswertung der Versuche miteinzubeziehen. In den Experimenten dieser Arbeit wurden daher alle Tubuli, die einen $R_{te} < 50 \Omega\text{cm}^2$ zeigten nicht in der Auswertung berücksichtigt. Ebenso wurde ein Verlust zwischen erster und zweiter Messung von $\geq 50 \Omega\text{cm}^2$ als Ausschlusskriterium festgelegt, um keine cCD in der Auswertung zu berücksichtigen, die im Verlauf des Experimentes ein Leck entwickelten.

Weitere Kriterien zum Ausschluss waren eine zu geringe Länge ($< 250 \mu\text{m}$, zu großer Einfluss des Widerstandes der Haltepipette) und ein zu großer Innendurchmesser ($> 17 \mu\text{m}$, z. B. ausgelöst durch zu hohen Perfusionsdruck). Beides würde zu einer Überschätzung des R_{te} (siehe 2.2.4.1.1) führen.

3 Ergebnisse

3.1 Salztransport über das Epithel des kortikalen Sammelrohres (cCD)

Zunächst sollen die elektrophysiologischen Eigenschaften des cCD anhand der Daten beschrieben werden, die unter Grundbedingungen an KT-cCD erhoben wurden. Dabei konnte in einer Gruppe von 20 perfundierten KT-cCD (Abbildung 17) ein lumennegatives V_{te} von im Mittel $-7,0 \pm 1,3$ mV (Abbildung 17A) festgestellt werden. R_{te} belief sich auf $117,9 \pm 10,6 \Omega\text{cm}^2$ (Abbildung 17B) und der I'_{sc} betrug $-65,2 \pm 13,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abbildung 17C).

3.1.1 Amilorid und Hydrochlorothiazid verändern transepithiale Spannung, transepithelialen Widerstand und äquivalenten Kurzschlussstrom von mikroperfundierten kortikalen Sammelrohren

Anschließend wurde der transzelluläre Transport mit Hilfe von Amilorid und HCT gehemmt (dazu siehe auch 1.5.4). Der Effekt dieser Diuretika im cCD konnte somit experimentell beobachtet werden. V_{te} ging auf $-0,9 \pm 0,4$ mV (Abbildung 17A) zurück und war statistisch nicht mehr von 0 verschieden. Die Inhibition der transzellulären Transportwege, vor allem des elektrogenen Na^+ -Transportes führte messbar zu einem Anstieg von R_{te} auf $150,6 \pm 11,2 \Omega\text{cm}^2$ (Abbildung 17B). Daraus resultierend sank I'_{sc} als Maß des elektrogenen Transportes auf $-6,3 \pm 2,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abbildung 17C).

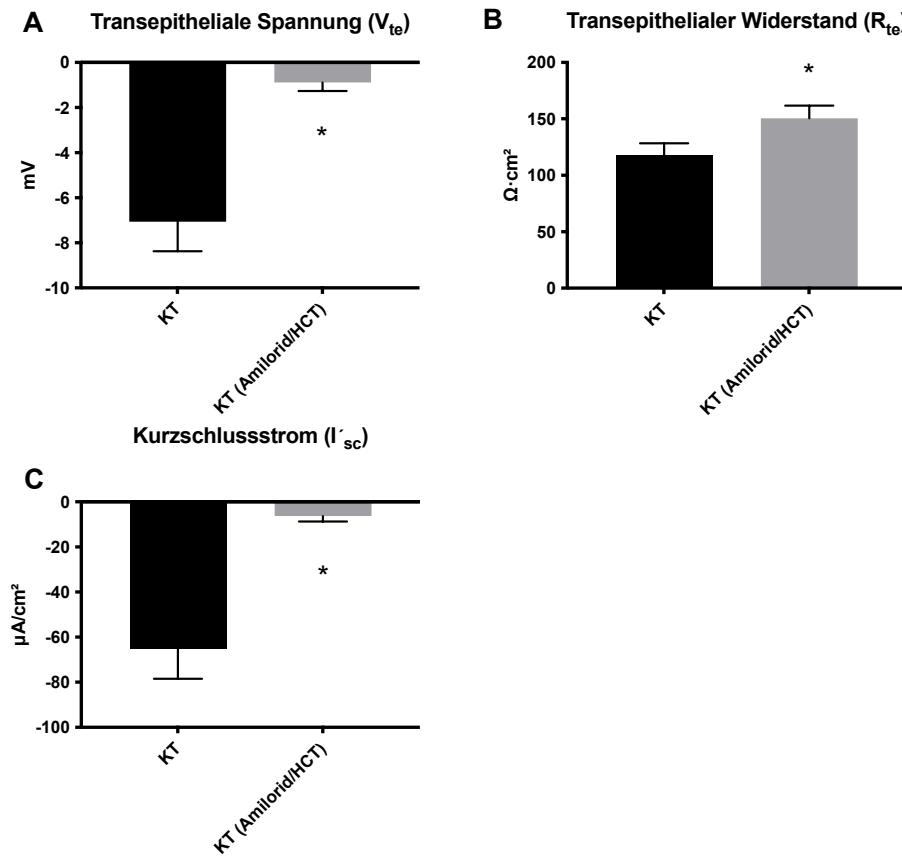


Abbildung 17: Elektrophysiologische Eigenschaften vor und nach Applikation von Amilorid und Hydrochlorothiazid in Kontrollen unter Standard-Na⁺-Diät

A: Transepithelial Spannung (V_{te}) in Kontrollen (KT). Zu sehen ist ein Abfall im Betrag von V_{te} nach Gabe von Amilorid & Hydrochlorothiazid (HCT), B: Transepithelialer Widerstand (R_{te}) in KT. Erhöhter R_{te} unter Amilorid und HCT, C: äquivalenter Kurzschlussstrom (I'_{sc}) in KT. Nach Hemmung des transzellulären Salztransports durch Amilorid und HCT reduziert sich der Betrag des I'_{sc} , der als Maß für den transzellulären Transport gilt deutlich. n=20; * p < 0,05, vor und nach Amilorid und HCT

3.1.2 Parazellulärer Weg im kortikalen Sammelrohr (cCD) zeigt Anionenselektivität

Unter Hemmung des transzellulären Transportes konnten anschließend die parazellulären Eigenschaften der cCD charakterisiert werden.

Die bestimmten DP (Abbildung 18) werden als Verhältnis (P_{Cl}/P_{Na}) angegeben. Dabei steht 1 für ein ausgeglichenes Verhältnis der Permeabilitäten der jeweiligen Ionen, also keiner Ionenselektivität.

Das P_{Cl}/P_{Na} (Abbildung 17B) betrug $1,30 \pm 0,06$, wobei auch Werte kleiner als 1 gemessen wurden, die auf eine Kationenpermeabilität hinweisen. Im Schnitt zeigten die cCD jedoch ein Anionen-präferierendes Verhalten. Die absoluten Permeabilitäten wurden dabei mit $P_{Na} 33,7 \pm 4,7 \times 10^{-3} \text{ cm/h}$ und $P_{Cl} 40,5 \pm 3,9 \times 10^{-3} \text{ cm/h}$ errechnet (Abbildung 17C).

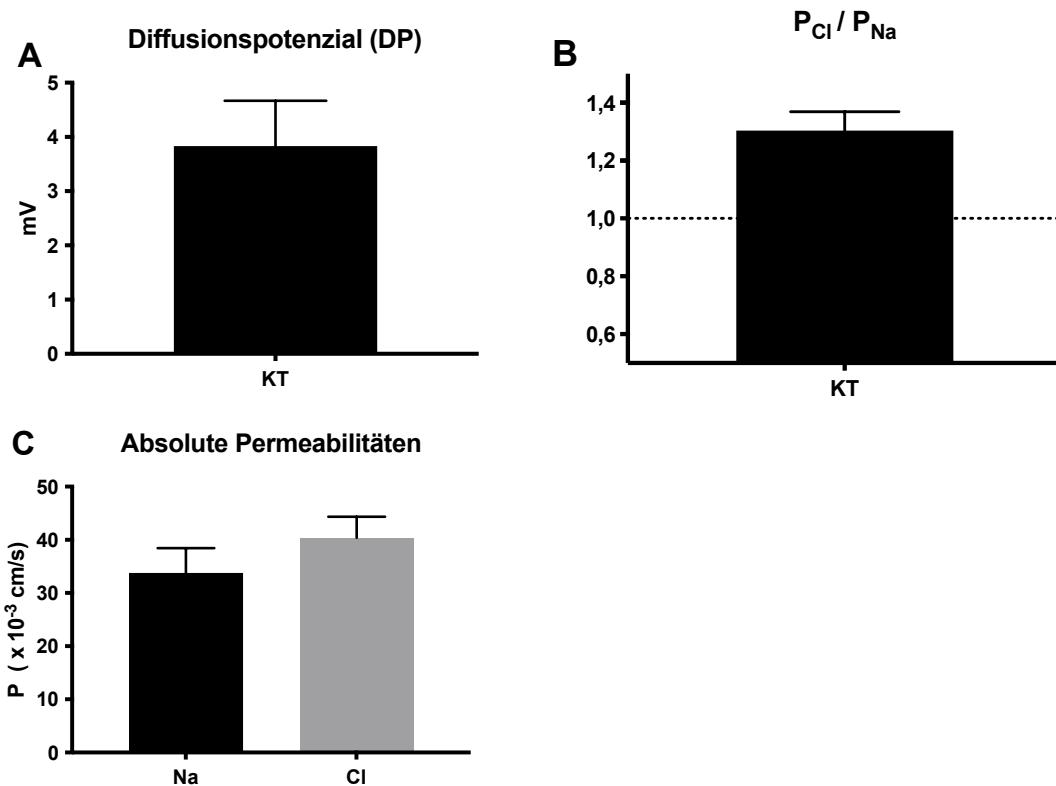


Abbildung 18: Diffusionspotenziale und Permeabilitäten für die Ionen Na^+ und Cl^- im kortikalen Sammelrohr (cCD) in Kontrollen unter Standard- Na^+ -Diät

A: Diffusionspotenzial (DP) in Kontrolle (KT). **B:** Permeabilitätsverhältnis (P_{Cl}/P_{Na}) in KT. P_{Cl}/P_{Na} betrug 1,30 und zeigte damit eine bessere Durchlässigkeit für Cl^- anstatt von Na^+ . **C:** Absolute Permeabilitäten in KT. Die absoluten Permeabilitäten beziehen den transepithelialen Widerstand (R_{te}) des Epithels in Anwesenheit der Diuretika mit ein, $n=20$.

3.1.3 Korrelation von transepithelialer Spannung (V_{te}) und Permeabilitätsverhältnis

Interessanterweise konnte eine lineare Korrelation zwischen V_{te} am Anfang des Experimentes, d. h. unter ungehemmten Transportvorgängen und dem P_{Cl}/P_{Na} beobachtet werden (Abbildung 19).

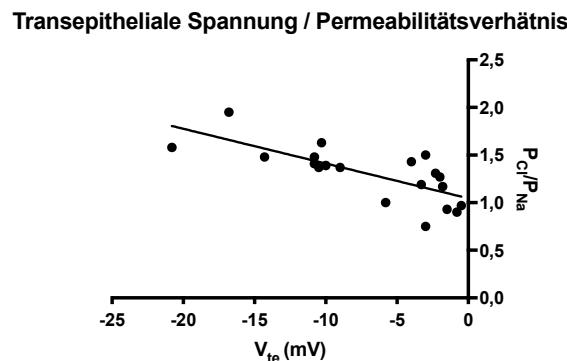


Abbildung 19: Korrelation von transepithelialer Spannung und Permeabilitätsverhältnis in Kontrollen
 Lineare Regressionsgrade $Y=-0,037*X+1,046$, $R^2: 0,543$, $Sy.x: 0,2009$, V_{te} = transepithelial Spannung, P_{Cl}/P_{Na} = Permeabilitätsverhältnis

Je negativer das durch den aktiven Na^+ -Transport generierte Potenzial desto anionenselektiver war der gemessene parazelluläre Weg.

3.2 Elektrophysiologische Eigenschaften bei Claudin-4-Defizienz (KO)

Zusätzlich zu der Gruppe der KT-Mäuse wurden auch insgesamt 21 Experimente mit cCD aus KO-Mäusen durchgeführt, um den Effekt des fehlenden Claudin-4 auf die elektrophysiologischen Eigenschaften beobachten zu können. Dabei zeigten sich ähnliche transzelluläre Eigenschaften wie in den KT. In Abbildung 20 sind die Werte der KT aus Abbildung 17 zur Übersicht noch einmal aufgezeigt. Sowohl V_{te} $-6,4 \pm 1,2$ mV (Abbildung 20A), der R_{te} $105,2 \pm 8,2$ Ωcm^2 (Abbildung 20B) und auch der I'_{sc} $-66,5 \pm 13,9$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abbildung 20C) zeigten keine signifikanten Abweichungen zum Messzeitpunkt vor Gabe der Hemmstoffe.

3.2.1 Amilorid und Hydrochlorothiazid (HCT) verändern transepithelialen Widerstand (R_{te}) in Claudin-4 defizienten kortikalen Sammelrohren (cCD) nicht

Nach luminaler Applikation von Amilorid (50 μM) und HCT (100 μM) verringerten sich die zuvor negative V_{te} und der I'_{sc} im Betrag analog zu den Beobachtungen in den KT-Mäusen. V_{te} lag nach Amilorid/HCT Gabe bei $0,4 \pm 0,6$ mV (Abbildung 20A). Der I'_{sc} war $5,4 \pm 5,9$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abbildung 20B). Anders als bei den KT kam es allerdings nur zu einem sehr geringen Anstieg vom R_{te} unter Amilorid/HCT und in Anwesenheit der Inhibitoren war R_{te} bei KO mit $112,5 \pm 7,9$ Ωcm^2 signifikant geringer (Abbildung 20C).

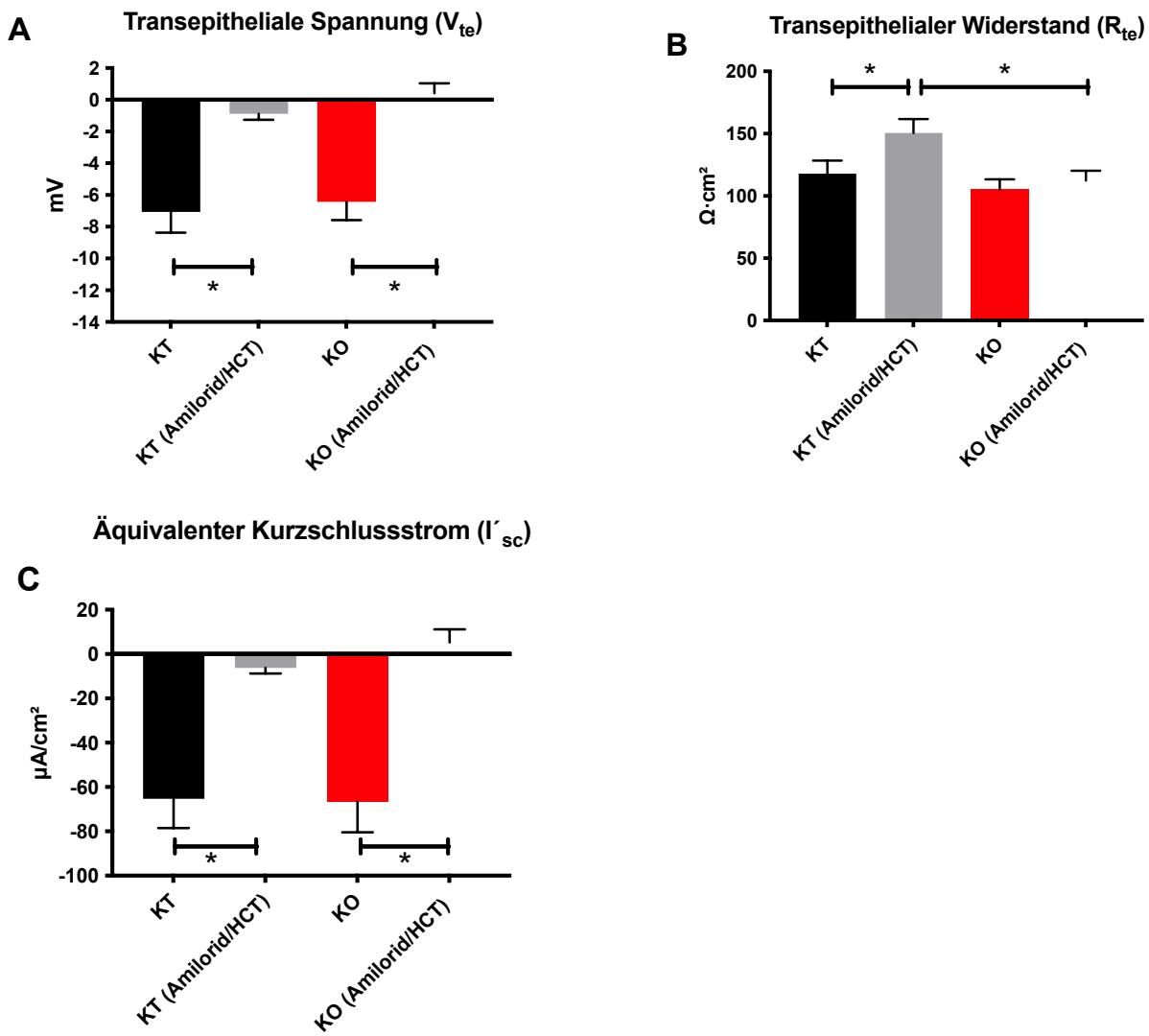


Abbildung 20: Elektrophysiologische Eigenschaften vor und während Applikation von Amilorid und Hydrochlorothiazid in Kontrollen und Claudin-4-Defizienz

A: Transepitheliale Spannung (V_{te}) von Kontrollen (KT) und Claudin-4-Defizienz (KO) im Vergleich jeweils vor und nach Applikation von Amilorid/Hydrochlorothiazid (HCT). Die Wirkung von Amilorid besteht auch in KO. **B:** Transepithelialer Widerstand (R_{te}) in KT und KO, je vor und nach Amilorid/HCT Gabe. Ein Anstieg im R_{te} in KO wurde nicht beobachtet. **C:** äquivalenter Kurzschlussstrom (I'_{sc}) in KT und KO im Vergleich vor und nach Amilorid/HCT Gabe. Der I'_{sc} zeigt einen deutlichen Abfall nach Gabe von Amilorid/HCT. KT n= 20; KO n=20, * p< 0,05.

3.2.2 Claudin-4 defiziente kortikale Sammelrohre (cCD) verlieren Selektivität für Cl^-

Während in den KT vornehmlich eine Selektivität für Cl^- festgestellt werden konnte, zeigte sich in den KO keinerlei Selektivität mit $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}} 1,02 \pm 0,03$. (Abbildung 22B). Die KT-Werte aus Abbildung 18 sind auch in diesem Fall zum Vergleich mit aufgetragen. Auch die gemessenen DP zeigten diesen Unterschied in der parazellulären Selektivität sehr deutlich (Abbildung 22A). Während sich in KT ein DP von $3,8 \pm 0,8$ mV zeigte, wurde dies in den KO mit $0,2 \pm 0,6$ mV gemessen (Abbildung 22A). In Abbildung 21 sind original Schreiberaufzeichnungen gezeigt.

Während in KT eine deutlicher Positivausschlag nach Applikation von 30-NaCl-Lösung zu beobachten war, zeigten KO kaum einen Ausschlag (negativ nach Liquid-Junction Korrektur, siehe auch 2.2.4). Die absoluten Permeabilitäten der KO betrugen $P_{Na} 45,8 \pm 3,0 \times 10^{-3}$ cm/h und $P_{Cl} 46,60 \pm 3,30 \times 10^{-3}$ cm/h, d.h. es erhöhte sich im Vergleich zu KT vor allem die P_{Na} (Abbildung 22C&D).

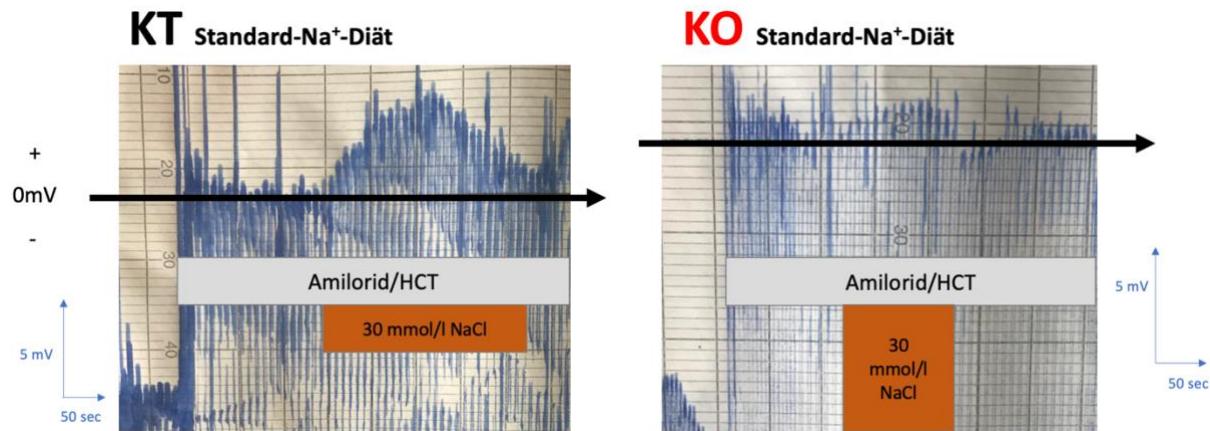


Abbildung 21: Originalexperiment Kontroll- und Claudin-4 defizientes-Sammelrohr unter Standard-Na⁺-Diät
Die Abbildung zeigt zwei Schreiberaufzeichnungen von V_{te} während der Perfusion eines Kontroll-cCD (KT) und eines Claudin-4 defizienten cCD (KO). **Links:** KT, von links nach rechts: Zu Beginn stellt sich ein transepitheliales Potenzial von circa -10 mV ein, nach Applikation von Amilorid zusammen mit Hydrochlorothiazid (HCT) (grauer Balken) ist dieses Potenzial neutralisiert. Durch die basolateral eingespülte 30-NaCl-Lösung (orangener Balken) entsteht ein in diesem Falle deutlich positives Diffusionspotenzial (DP); **Rechts:** KO, deutlicher Amilorideffekt (grauer Balken), das DP durch 30-NaCl-Lösung (orange) ist nur minimal positiv.

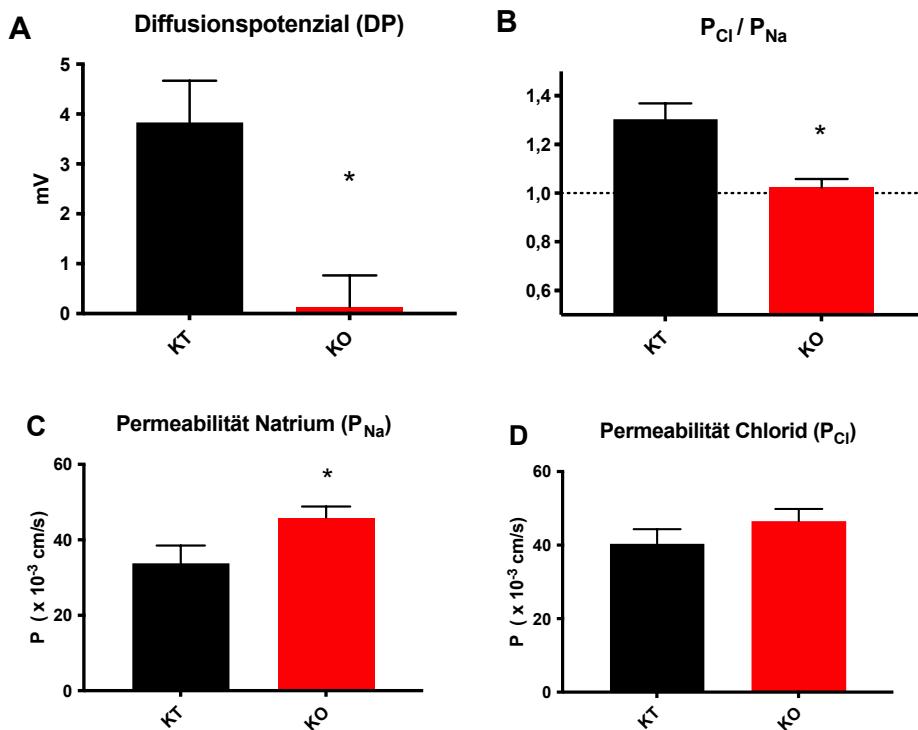


Abbildung 22: Parazelluläre Eigenschaften von Claudin-4 defizienten und Kontroll-Sammelrohren im Vergleich.

A: Diffusionspotenzial (DP) von KT und KO. Deutlicher Unterschied im DP in KO. **B:** Permeabilitätsverhältnis (P_{Cl}/P_{Na}). In KT ist Cl⁻-Selektivität erkennbar, in KO ist keine Selektivität für Cl⁻ mehr erkennbar. **C&D:** Absolute Permeabilitäten für Na⁺ (P_{Na}) (C) und Cl⁻ (P_{Cl}) (D), jeweils KT und KO. Auffällig ist vor allem die erhöhte P_{Na} in KO, was zu dem ausgeglichenen (P_{Cl}/P_{Na}) beiträgt, andererseits ist auch eine tendenzielle Erhöhung der P_{Cl} zu sehen, d. h. der unspezifische Leitwert ist in KO höher. KT n=20, KO n= 20, * p< 0,05

Auch wenn man die gemessenen KO als Einzelpunkte im Vergleich zum anfänglich gemessenen V_{te} aufträgt (wie KT in Abbildung 19), zeigt sich keine Korrelation, sondern nur leichte Schwankungen um 1 über die gesamte Bandbreite von V_{te} (Abbildung 23).

Transepitheliale Spannung / Permeabilitätsverhältnis

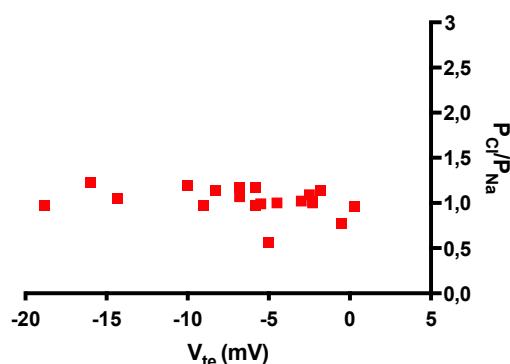


Abbildung 23: Auftrag von transepithelialer Spannung und Permeabilitätsverhältnis in Claudin-4 defizienten Tieren

Geradengleichung: $Y = -0,004900 * X + 1,165$, Sy.x: 0,2339, V_{te} = transepitheliale Spannung, P_{Cl}/P_{Na} = Permeabilitätsverhältnis

3.3 Effekt von Niedrig-Na⁺-Diät (NND) auf elektrophysiologische Eigenschaften

Die Messungen wurden in einer salzarmen Stoffwechselleage wiederholt. Die zu untersuchenden Mäuse erhielten dazu für sieben bis neun Tage eine NND, um über Salzmangel die physiologische hormonale Regulation, vor allem über Aldosteron, zu stimulieren. Die elektrophysiologischen Kennwerte waren in den anschließenden Messungen deutlich verändert. Wieder sind die Werte der vorherigen Abbildungen zur besseren Vergleichbarkeit erneut mit in den Abbildungen dargestellt.

Abbildung 24 zeigt exemplarisch zwei Original-Experimente.

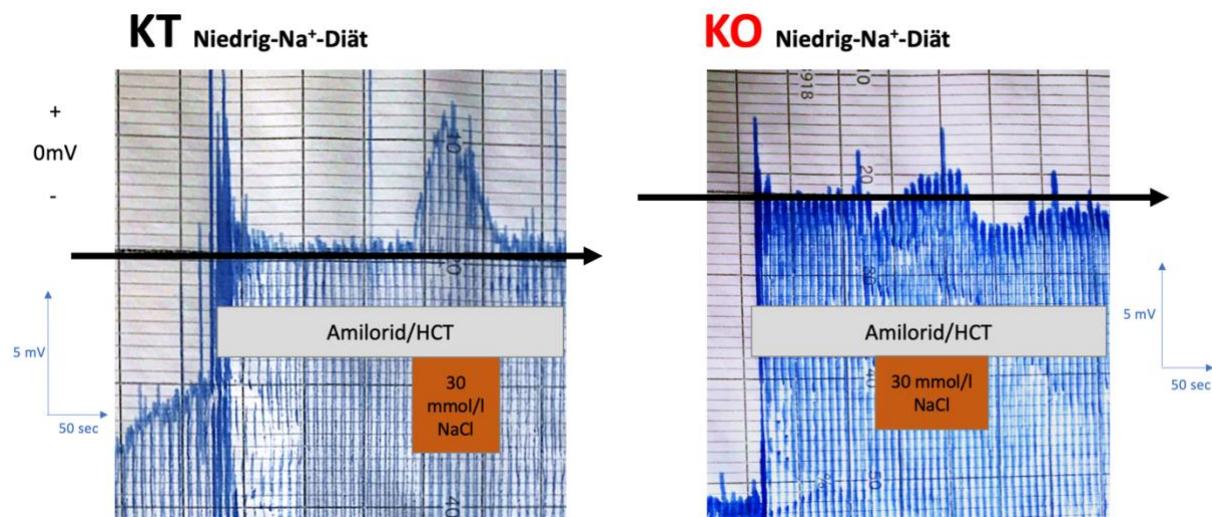


Abbildung 24: Originalexperiment einer Kontrolle und eines Claudin-4 defizienten Sammelrohres unter Niedrig-Na⁺-Diät

Schreiberaufzeichnungen von V_{te} während der Perfusion (für Standard-Na⁺-Diät vgl. Abbildung 21) **Links:** Kontrolle (KT), Wirkung von Amilorid/Hydrochlorothiazid (HCT) und deutliches positives Diffusionspotenzial (DP) nach basolateraler Applikation von 30-NaCl-Lösung. **Rechts:** Claudin-4-Defizienz (KO), transepitheliales Potenzial mit circa -30 mV sehr ausgeprägt, das DP ist gering.

Sowohl die KT ($-15,7 \pm 2,0$ mV) als auch die KO ($-23,0 \pm 3,2$ mV) zeigten unter der Diät ein deutlich negativeres V_{te} (Abbildung 25A). Der I'_{sc} , als Maß für den transzellulären Transport war im Gegensatz zur Normaldiät ebenfalls erhöht (KT: $-171,9 \pm 28,6$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ und KO: $-261,3 \pm 35,3$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) (Abbildung 25B). Der R_{te} vor Amilorid/HCT-Gabe war unter der NND sowohl in KO als auch KT nur sehr geringfügig niedriger (KT: $106,1 \pm 7,4$ Ωcm^2 und KO: $96,5 \pm 12,8$ Ωcm^2) (Abbildung 25C).

3.3.1 Amilorid und Hydrochlorothiazid (HCT) enthüllen hohen parazellulären transepithelialen Widerstand (R_{te}) der Claudin-4 defizienten (KO) Sammelrohre (CD)

Im Vergleich zur Normaldiät war die Wirkung der Hemmstoffe nach Stimulation des transzellulären Transportes durch NND deutlich stärker ausgeprägt. Interessanterweise war aber der R_{te} unter NND in den KO vor Hemmung eher niedriger und nach Hemmung des transzellulären Transportes durch Amilorid und HCT im Vergleich zur Kontrolldiät stark erhöht. Unter NND stieg in den KO der parazelluläre R_{te} also an, da unter diesen Bedingungen der parazelluläre Weg weitgehend den R_{te} bestimmt (Abbildung 25D).

Gemessen wurden in den KO unter Amilorid/HCT $192,1 \pm 15,6 \Omega\text{cm}^2$ (Abbildung 25D). Der Wert in KT war unter Amilorid $143,5 \pm 10,4 \Omega\text{cm}^2$.

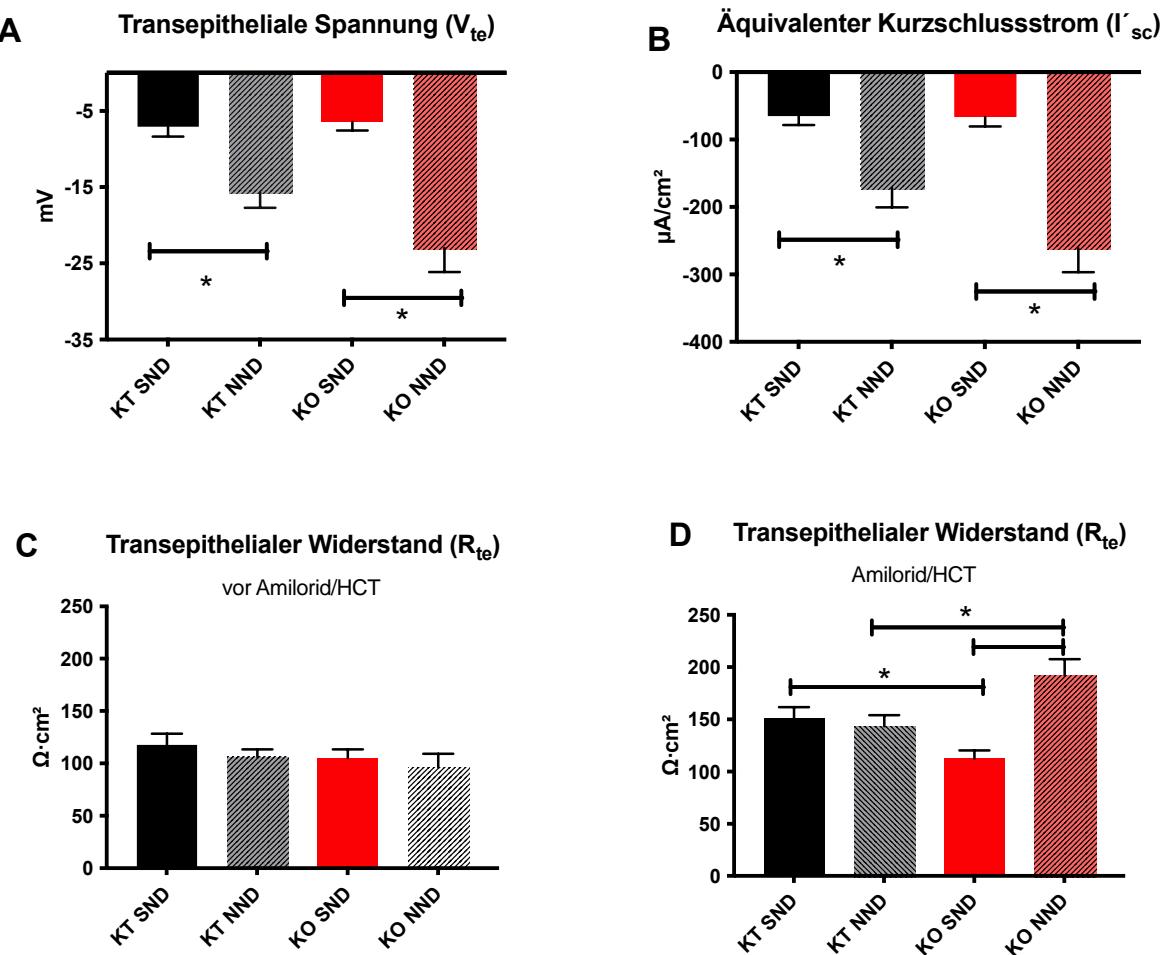


Abbildung 25: Elektrophysiologische Eigenschaften von kortikalen Sammelrohren bei Claudin-4-Defizienz und in Kontrollen unter Niedrig-Na⁺-Diät im Vergleich mit Standard-Na⁺-Diät

A&B: Transepitheliale Spannung (V_{te}) & äquivalenter Kurzschlussstrom (I'_{sc}) in Kontrollen (KT) und Claudin-4 defizienten (KO) kortikalen Sammelrohren (cCD) unter Niedrig-Na⁺-Diät (NND) und Standard-Na⁺-Diät (SND) im Vergleich. V_{te} ist unter Salzmangel deutlich negativer. Vor allem in Zusammenschau mit dem I'_{sc} wird deutlich, dass mehr Salz transportiert wird als unter SND. Diese Beobachtung ist sowohl im KT als auch im KO klar zu erkennen. Tendenziell transportieren die Tiere noch mehr. **C&D:** Transepithelialer Widerstand (R_{te}) in KT und KO unter den verschiedenen Diäten. Der R_{te} ist je vor (C) und nach (D) Gabe von Amilorid und Hydrochlorothiazid (HCT) gezeigt. Vorher sind sehr ähnliche R_{te} in allen Gruppen ersichtlich. Nach Hemmung des zellulären Transportes kann der parazelluläre R_{te} betrachtet werden. Dieser ist unter SND im KO niedriger. Nach Gabe von NND in KO fällt dieser allerdings deutlich größer aus. KT SND n= 20, KO SND, n= 20, KT Niedrig-Na⁺-Diät n= 24, KO NND n= 18, * p< 0,05

3.3.2 Niedrig-Na⁺-Diät (NND) hat keinen Einfluss auf die parazelluläre Selektivität

Auch unter NND wurde nach Amilorid/HCT Applikation ein DP erzeugt und gemessen (Abbildung 26A). Die KT zeigten dabei ein DP von $3,2 \pm 0,6$ mV während in den KO $-0,6 \pm 0,4$ mV gemessen wurden. Daraus gehen die Ionenselektivitäten von $P_{Cl}/P_{Na} 1,24 \pm 0,05$ in den KT und $P_{Cl}/P_{Na} 0,97 \pm 0,02$ in den KO hervor (Abbildung 26B).

Dies zeigt, dass die NND keinen Einfluss auf die Cl⁻-Selektivität in KT hatte und sich ebenfalls nicht auf die Unselektivität der KO auswirkte.

Die absoluten Permeabilitäten fielen aufgrund des deutlich höheren R_{te} der KO geringer aus (Abbildung 26C und D).

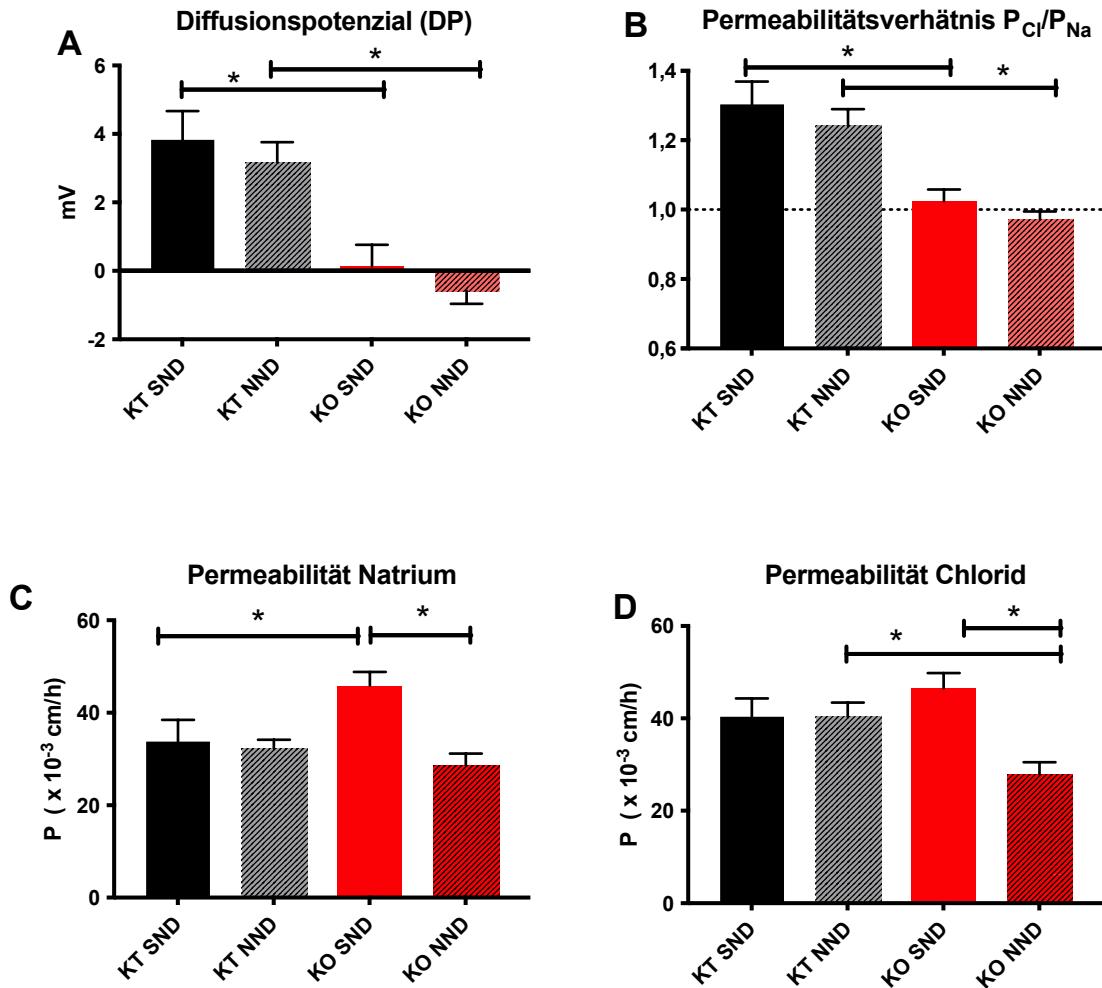


Abbildung 26: Diffusionspotenziale, Permeabilitätsverhältnisse und absolute Permeabilitäten der verschiedenen Experimentalgruppen

A: Diffusionspotenzial (DP) nach den verschiedenen Diäten in Kontrollen (KT) und Claudin-4 defizienten (KO) kortikalen Sammelrohren (cCD). Die DP sind durch die Niedrig-Na⁺-Diät (NND) quasi nicht verändert. KT zeigen im Gegensatz zu KO deutliche positive Ausschläge. **B:** Permeabilitätsverhältnisse (P_{Cl}/P_{Na}) der verschiedenen Diäten in KT und KO im Vergleich. Die KT zeigen eine Cl⁻-Selektivität, die durch die NND nicht beeinflusst wurde. Auch die KO behalten unter NND die parazelluläre Unselektivität bei. **C&D:** Absolute Permeabilitäten nach Diäten im Vergleich. Diese Werte sind nur in Zusammenschau mit den Werten für den transepithelialen Widerstand (R_{te}) (Abbildung 25D) sinnvoll zu betrachten, da der R_{te} einen großen Effekt auf die Permeabilitäten hat. Je höher der R_{te} ist, desto kleiner die absolute Permeabilität. Auffallend sind die sehr niedrigen Permeabilitäten in KO unter NND. Dort wurde aber auch ein hoher R_{te} beobachtet (vgl. Abbildung 25D). KT Standard-Na⁺-Diät (SND) n= 20, KO SND n= 20, KT NND n= 24, KO NND n= 18, * p< 0,05.

Wenn man nun für beide Genotypen die Selektivitäten gegen das anfängliche V_{te} aufträgt, sieht man auch für die KT-Maus immer noch die Anionenselektivität. Die Korrelation zwischen V_{te} und Selektivität war aber nicht mehr vorhanden (vgl. Abbildung 27).

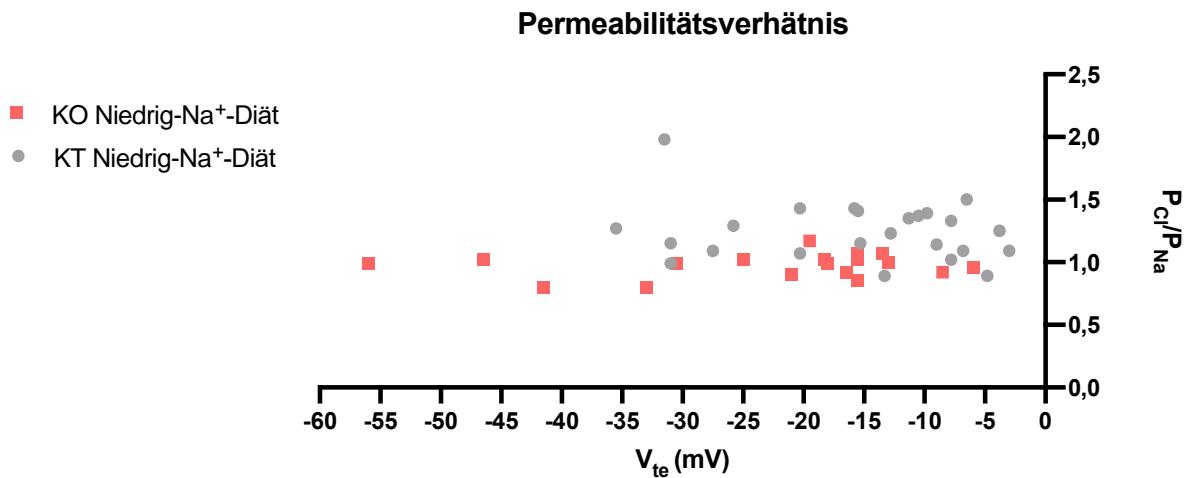


Abbildung 27: Auftrag von transepithelialer Spannung und Permeabilitätsverhältnis in Kontrollen und Claudin-4 defizienten Sammelrohren unter Niedrig-Na⁺-Diät

V_{te} = transepitheliale Spannung, P_{Cl}/P_{Na} = Permeabilitätsverhältnis, Geradengleichung Kontrolle (KT) Niedrig-Na⁺-Diät (NND): $Y = -0,0084 * X + 0,9699$, Sy.x:0,1503 und Geradengleichung Claudin-4-Defizienz (KO) NND: $Y = 0,0013 * X + 1,002$, Sy.x: 0,0966

3.4 Inkubation mit Niedrig-Cl⁻-Lösung verändert die Ionenselektivität

In einer weiteren Messreihe sollten vor allem regulatorische Mechanismen des parazellulären Transportes untersucht werden. Dazu wurden cCD aus KO- und KT-Mäusen isoliert und in das Perfusionssystem eingespannt. Nach kurzer Äquilibrierungsphase wurden 50 µM Amilorid luminal appliziert. Jedes cCD wurde anschließend für 15 Minuten mit einer Niedrig-Cl⁻-Lösung (5 mM NaCl) oder einer angepassten Kontrolllösung (145 mM NaCl) unter Perfusion inkubiert. Anschließend erfolgte ein Auswaschen der Lösungen mit Kontrolllösung über 5 Minuten ehe das DP erzeugt und gemessen wurde. Insgesamt wurden folgende Experimente durchgeführt:

Genotyp	NaCl Gehalt	Anzahl Experimente
KT	145 mM NaCl	n=11
KT	5 mM NaCl	n=10
KO	145 mM NaCl	n=15
KO	5 mM NaCl	n=10

Tabelle 11: Einteilung der Experimentalgruppen

Die Tabelle zeigt die vier Gruppen der Experimente und die zugehörige Anzahl der Experimente (n), insgesamt wurden sechsundvierzig kortikale Sammelrohre (cCD) in vier verschiedenen Gruppen perfundiert. KT: Kontrollen, KO: Claudin-4-Defizienz

3.4.1 Transzelluläre Eigenschaften vor Inkubation zeigen ähnliche Ausgangsbedingungen

In allen vier untersuchten Gruppen zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in V_{te} , R_{te} und I'_{sc} , bevor die Inkubation mit den verschiedenen Lösungen begann (Abbildung 28). Auch gepoolt (KT und KO zusammen) ergeben sich keine Unterschiede (KT $-11,5 \pm 3,6$ mV, KO $-9,2 \pm 1,4$ mV) und die Werte sind etwas negativer, aber vergleichbar zu den Werten in den vorherigen Experimenten.

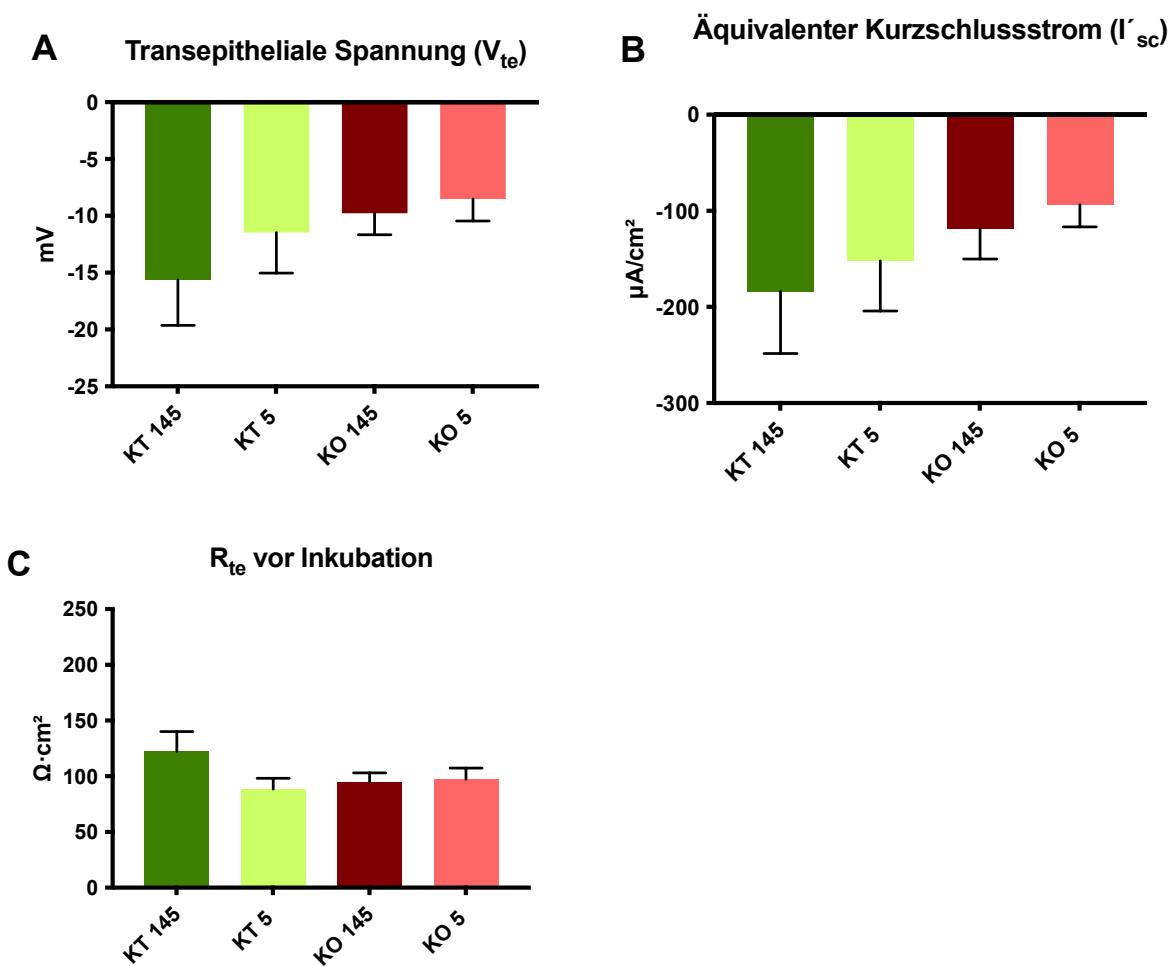


Abbildung 28: Elektrophysiologische Eigenschaften vor Beginn der Inkubation

A: Transepitheliale Spannung (V_{te}) in Kontrollen (KT) und Claudin-4 defizienten (KO) kortikalen Sammelrohren (cCD) vor Inkubation. **B:** Äquivalenter Kurzschlussstrom (I'_{sc}) vor Inkubation **C:** Transepithelialer Widerstand (R_{te}) vor Inkubation, ohne Amilorid/Hydrochlorothiazid. Für n siehe Tabelle 11.

3.4.2 Veränderungen im transepithelialen Widerstand (R_{te}) nach 15 Minuten Inkubation

Nach insgesamt 15 Minuten Inkubation mit entweder Niedrig-Cl⁻-Lösung oder Kontrolllösung stellten sich Unterschiede im R_{te} der KT dar (Abbildung 29). Der R_{te} war nach Inkubation mit 5 mM Niedrig-Cl⁻-Lösung niedriger ($127,0 \pm 12,2 \Omega \cdot cm^2$) im Vergleich zum R_{te} unter Inkubation mit Kontrolllösung 145 mM NaCl ($208,2 \pm 22,6 \Omega \cdot cm^2$), obwohl zum Messzeitpunkt in beiden

Fällen bereits wieder Kontrollbedingungen herrschten (5 min Re-Äquilibrierung). In KO konnte dies nicht beobachtet werden.

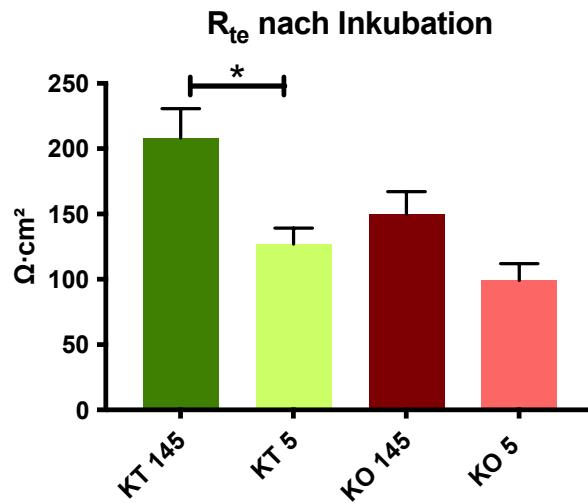


Abbildung 29: Transepithelialer Widerstand nach Inkubation

Die Vorbehandlung mit Niedrig-Cl⁻-Lösung führte in Kontrollen (KT) zu einer Senkung des transepithelialen Widerstandes (R_{te}). In den Claudin-4 defizienten (KO) kortikalen Sammelrohren (cCD) hatte die Cl⁻-Konzentration während der Inkubationszeit keinen Einfluss. In der Tendenz waren die Widerstände in KO wieder niedriger als die in KT, auch wenn in diesem Experiment mit mehrfacher Testung keine Signifikanz erreicht wurde. * p<0,05.

3.4.3 Niedrig-Cl⁻-Inkubation erhöht die Cl⁻-Permeabilität (P_{Cl^-}) in Abhängigkeit von Claudin-4

Nachdem die Inkubationslösungen über fünf Minuten ausgewaschen waren (Re-Äquilibrierung), wurde das DP mit der 30-NaCl-Lösung erzeugt. Dieses wurde gemessen und wiederum in die Ionenpermeabilität umgerechnet. In Abbildung 30 sind zwei Originalexperimente aus der KT-Gruppe nach Inkubation mit 145 mM Kontrolllösung und 5 mM Niedrig-Cl⁻-Lösung im Vergleich zu zwei Experimenten in KO gezeigt.

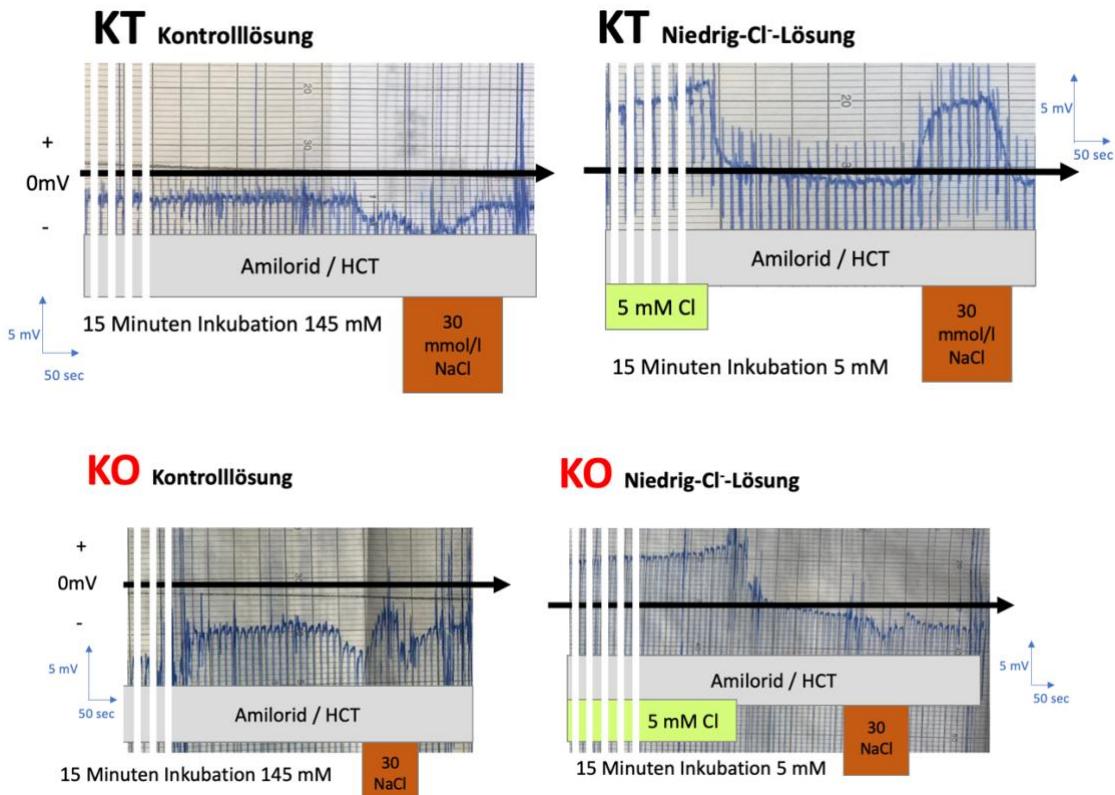


Abbildung 30: Originalexperimente Niedrig-Cl⁻-Inkubation in Kontrolle und Claudin-4 defizienter Maus

Die vier Abbildungen zeigen Aufzeichnungen aus Experimenten der Inkubationsmessungen. **Oben:** Kontrolle (KT) mit Inkubation von Kontrolllösung (links) und Niedrig-Cl⁻-Lösung (rechts). **Links:** 145mM Kontrolllösung mit Amilorid und Hydrochlorothiazid (HCT). Applikation von 30-NaCl-Lösung (orangener Balken) erzeugt eine positive Diffusionspotential (DP) -Änderung. **Rechts:** Inkubation mit 5mM Niedrig-Cl⁻-Lösung (grüner Balken) bewirkt ein DP unter 30-NaCl-Lösung (orange), das im Vergleich zur Kontrollinkubation deutlich positiver ausfällt (vgl. dazu Abbildung 31A). **Unten:** Gleiches Experiment in Claudin-4-Defizienz (KO). Unter Kontrollinkubation zeigt sich ein geringes positives DP (links), auf der rechten Seite ist nach Niedrig-Cl⁻-Inkubation keine Steigerung des DP zu erkennen (vgl. dazu Abbildung 31A).

Es stellte sich heraus, dass P_{Cl} (Abbildung 31D) erhöht war, nachdem durch die Niedrig-Cl⁻-Lösung ein Cl⁻-Mangel simuliert wurde (KT 145 mM Kontrolllösung: $P_{Cl} 29,2 \pm 5,5 \times 10^{-3}$ cm/h und KT 5 mM Niedrig-Cl⁻-Lösung: $P_{Cl} 50,5 \pm 4,8 \times 10^{-3}$ cm/h) (Abbildung 31D). Dies ging aus dem deutlich positiveren DP der KT Inkubation mit Niedrig-Cl⁻-Lösung hervor (DP KT 145 mM $1,5 \pm 0,8$ mV und KT 5 mM $8,2 \pm 1,3$ mV) (Abbildung 31A). Zudem stieg auch P_{Cl}/P_{Na} deutlich an (KT 145 mM Kontrolllösung $1,12 \pm 0,06$ und KT 5 mM Niedrig-Cl⁻-Lösung $1,75 \pm 0,18$) (Abbildung 31B).

Diese Beobachtung wurde nur in KT-cCD gemacht und nicht in den KO, welche kein Claudin-4 in den TJ der Hauptzellen exprimierten (KO 145 mM Kontrolllösung: $P_{Cl} 40,1 \pm 3,9 \times 10^{-3}$ cm/h und $P_{Cl}/P_{Na} 1,28 \pm 0,11$ sowie KO 5 mM Niedrig-Cl⁻-Lösung: $P_{Cl} 50,6 \pm 7,3 \times 10^{-3}$ cm/h und $P_{Cl}/P_{Na} 1,27 \pm 0,10$) (Abbildung 31B und D). Durch die somit ausgebliebene Veränderung in den KO durch Niedrig-Cl⁻ -Inkubation ergeben sich Unterschiede zwischen KT und KO in DP

(KT 5 mM $8,2 \pm 1,3$ mV, KO 5 mM $3,3 \pm 1,3$ mV) (Abbildung 31A) und P_{Cl}/P_{Na} (KT 5 mM $1,75 \pm 0,18$, KO 5 mM $1,27 \pm 0,10$) (Abbildung 31B).

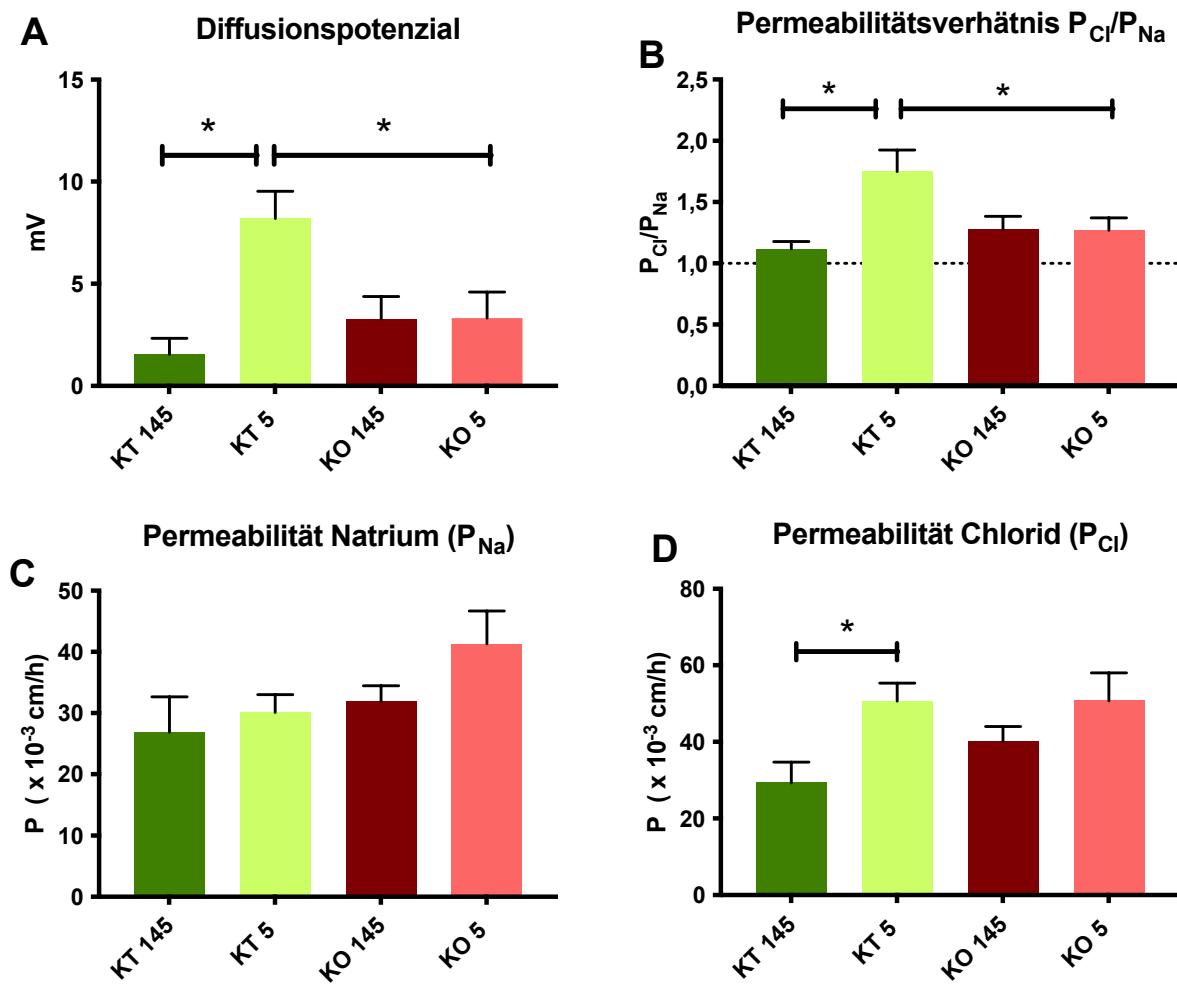


Abbildung 31: Parazelluläre Ionenpermeabilitäten nach Inkubation

A: Das Diffusionspotenzial (DP) ist in Kontrollen (KT) nach Niedrig-Cl⁻-Inkubation deutlich positiver, in Claudin-4-Defizienz (KO) entsteht dieser Unterschied nicht. B: Das Permeabilitiesverhältnis (P_{Cl}/P_{Na}) zeigt sich analog zu den DP in KT nach Niedrig-Cl⁻-Inkubation verändert. C: Die Inkubation hat keinen Einfluss auf die Permeabilität von Na⁺ (P_{Na}). D: Nach Inkubation mit 5 mM Niedrig-Cl⁻-Lösung ist die parazelluläre Permeabilität von Cl⁻ (P_{Cl}) in KT erhöht. Dieser Effekt existiert nur in KT nicht in KO. Für n siehe Tabelle 12, * p < 0,05.

Da gleichzeitig der R_{te} in den KT nach Niedrig-Cl⁻-Inkubation absank, ergibt sich daraus, dass reduzierte basolaterale Cl⁻-Konzentrationen direkt zu einem Anstieg der P_{Cl} in KT führte (Abbildung 31D).

4 Diskussion

4.1 Methodische Limitationen

4.1.1 Homogenität der Versuchstiere in Bezug auf Alter und Geschlecht

Alter und Geschlecht der Versuchstiere sind Variablen, die sich signifikant auf quantitative Daten auswirken können. Aus diesem Hintergrund wären große Tierzahlen erforderlich, um eine perfekte Zusammensetzung aller Versuchsgruppen zu erreichen. Dem steht das Interesse gegenüber, möglichst wenige Tiere zu verbrauchen. Weiter spielen praktische Aspekte wie die limitierte Anzahl von Experimenten pro Zeit auf Grund der Schwierigkeit des Experiments an sich und die erreichbare Messgenauigkeit eine Rolle. In dieser Studie sollten zunächst grundlegende qualitative und quantitative Auswirkungen des Fehlens eines wichtigen Funktionsproteins im cCD der Niere untersucht werden. Auf eine hohe Auflösung zwischen Altersgruppen und Geschlechtern wurde in diesem ersten Ansatz verzichtet. In den Versuchen wurden sowohl weibliche als auch männliche junge Mäuse verwendet. Die Daten wurden gepoolt. Das Alter der Tiere war mit acht bis dreizehn Wochen ausgewogen, die Nierenreifung abgeschlossen und die Seneszenz noch nicht erreicht (Schwartz, Zavilowitz et al. 1992). In der Gruppe der SND waren die KO-Mäuse im Durchschnitt etwas älter, die Geschlechtsverteilung war ausgeglichen. Die Gruppe unter NND zeigte untereinander zwischen KT und KO keine signifikanten Altersunterschiede, jedoch waren etwas mehr weibliche Tiere in der KO-Gruppe. Für das CD sind Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren in der Wasserhomöostase durch AQP 2 beschrieben (Cheema, Irsik et al. 2015, Nair, Yanhong et al. 2019). Auch im Salztransport bestehen geschlechtsspezifische Unterschiede, diese sind jedoch in der TAL beschrieben (Wittner, Desfleurs et al. 1997). Prinzipiell wird in der Grundlagenforschung darauf Wert gelegt, beide Geschlechter miteinzubeziehen (Zucker and Beery 2010). Die Analyse der vorliegenden Daten getrennt nach Geschlechtern ergab, mit der Einschränkung der Aussagekraft durch die relativ niedrige Anzahl der jeweiligen Experimente, keinen Anhalt für Unterschiede.

4.1.2 Claudin-4 defiziente Maus

Claudin-4 wurde mit Hilfe des Cre/loxP-Systems in allen Zellen mit aktivem AQP 2 Promotor genetisch entfernt (siehe dazu 2.1.3) (Gong, Yu et al. 2014). Im CD exprimieren PC AQP 2, nicht

jedoch IC (Li, Wang et al. 2017, He and Yang 2019). Prinzipiell bestehen TJ zwischen PC untereinander, aber auch zwischen PC und IC sowie zwischen IC untereinander. Da IC kein AQP 2 exprimieren und die Cre-Rekombinase daran gekoppelt war, wurde dort auch kein KO von Claudin-4 durchgeführt. Insofern musste also Claudin-4 in allen TJ zwischen PC und zwischen PC und IC fehlen. Über die Auswirkung des KO auf Kontakte zwischen IC kann keine sichere Aussage getroffen werden. Allerdings gibt es qualitative Hinweise darauf, dass die TJ im gesamten CD der KO kein Claudin-4 mehr enthalten. Hierzu wurden von Lieske Jarck in unserem Labor parallel zu der vorliegenden Arbeit Antikörperfärbungen von Claudin-4 im CD durchgeführt (Abbildungen siehe Dissertation Lieske Jarck, Physiologisches Institut der CAU Kiel). In KT war ein dichtes TJ Netzwerk mit Claudin-4 zu sehen, was für die Expression in allen Zellarten spricht. In KO zeigten einzelne Zellen zwar noch vermehrte intrazelluläre Färbung, jedoch keine TJ-Stränge. Da intrazelluläres Claudin-4 keinen direkten Einfluss auf die parazellulären Eigenschaften hat (Hagen 2017), ist davon auszugehen, dass der KO von Claudin-4 funktionell sogar die TJ des gesamten CD erfasst hat.

4.1.3 *In-vitro* Tubulusperfusion

Die *in-vitro* Tubulusperfusion (hier CD-Perfusion) ist eine geeignete, wenn auch komplexe Methode, um die epithelialen Transportvorgänge in Nierentubuli zu untersuchen. Sie geht auf *Burg und Greger* zurück (Burg, Isaacson et al. 1968, Greger and Hampel 1981). Einer der großen Vorteile ist, dass man ganze Zellverbände in möglichst naturnahem Zustand untersuchen kann. Als alternative Möglichkeit wären Transportvorgänge auch in Zellkulturen auf Filtern zu untersuchen, was technisch weniger anspruchsvoll ist. Jedoch führt die Kultivierung zu einer gewissen Entdifferenzierung, was besonders eindrücklich auch am höheren elektrischen R_{te} sichtbar ist. So entwickeln Primärkulturen Widerstände von $800 \Omega\text{cm}^2$ (Gross, Minuth et al. 1986). Permanente Zellkulturen wie die M1 Zelllinie zeigen sogar Widerstände von $>2000 \Omega\text{cm}^2$ (Steensgaard, Svenningsen et al. 2010). Zusätzlich geht die Zellheterogenität, also die eigentliche funktionelle Vielfalt, verloren, da sich in Kultur vor allem PC entwickeln (Fejes-Toth and Naray-Fejes-Toth 1992). Damit stellt die *in-vitro* Perfusion den Goldstandard für die grundlegende Charakterisierung des epithelialen Ionentransportes in einem Tubulussegment dar.

4.2 Transzelluläre Transporteigenschaften im Sammelrohr

4.2.1 Transzellulärer elektrogener Natriumtransport unter Standard-Natrium-Diät (SND)

Soll Salzresorption durch die PC im CD stattfinden, wird Na^+ über den ENaC luminal in die Zelle aufgenommen, wobei die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase als Triebkraftgenerator fungiert und den basolateralen Na^+ -Transport gewährleistet. K^+ kann die Zelle luminal verlassen. Dabei stellt sich, wenn man das basolaterale („blutseitige“) Kompartiment als Referenz nimmt, ein lumennegatives transepitheliales Potenzial ein (Pearce, Soundararajan et al. 2015). Dieses wurde hier als V_{te} gemessen. Die Messungen von V_{te} im KT unter SND zeigten durchweg negative Werte, jedoch eine große Variabilität zwischen den einzelnen CD. Es wurden Werte zwischen -20,8 mV und -0,5 mV gemessen, der Durchschnitt betrug -7,0 mV (Abbildung 17 A). Der R_{te} lag zwischen 51,5 und 209,2 Ωcm^2 (Durchschnitt 117,9 Ωcm^2) (Abbildung 17 B) und zeigte somit ebenfalls eine Variabilität. Der berechnete I_{sc} als Maß für den elektrogenen zellulären Transport zeigte entsprechend Werte zwischen -175 und -8 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Abbildung 17 C). Vergleichbare Streuungen wurden auch in den Ausgangsmessungen vor der Inkubation mit Niedrig- Cl^- -Lösung bzw. Kontrolllösung beobachtet, die ebenfalls unter SND erfolgten. Eine Erklärung für die Streubreite könnte, neben der Messtechnik, im individuell unterschiedlichen Salzbedarf der Tiere bei normalem Salzangebot liegen. Diese physiologische Bandbreite wurde im weiteren Verlauf der Experimente durch eine NND eingegrenzt.

Die in dieser Arbeit erhobenen Werte von V_{te} entsprechen den aus der Literatur bekannten. In einer Zellkultur aus PC wurde ein V_{te} von im Schnitt -7,7 mV gemessen (Gross, Minuth et al. 1986). In der M-1 Zelllinie, die aus isolierten CD erzeugt wurde, zeigten sich eine Potenzialdifferenz von jeweils -21,5 mV und -45,7 mV im Mittel (Stoos, Naray-Fejes-Toth et al. 1991). Experimente mit isolierten CD aus Kaninchen, die ebenfalls mit der *in-vitro* Perfusion gemessen wurden, zeigten ein V_{te} von circa -8 mV (Muto, Ebata et al. 1994) bzw. -10,5 mV (Sansom, Weinman et al. 1984). Auch die große Variabilität von V_{te} im CD ist aus Kaninchen bekannt, dort wurden Werte von -30 mV bis zu +8 mV gemessen (O’Neil RG 1982).

Der R_{te} aus einigen Zellkulturen von PC ist nicht mit den hier gemessenen Werten in Einklang zu bringen, da deutlich höhere Werte um die 2000 Ωcm^2 gemessen wurden (Gross, Minuth et al. 1986, Steensgaard, Svenningsen et al. 2010). Eine primäre Zellkultur aus Ratten-CD zeigte

wiederum Werte von $168 \Omega\text{cm}^2$ und aus Kaninchen-CD $138 \Omega\text{cm}^2$, was sich mit den hier erhobenen Werten deckt (Husted, Hayashi et al. 1988). In der Perfusion von CD aus Kaninchen wurde ein R_{te} von $203 \Omega\text{cm}^2$ beschrieben, ein Bereich, der sich mit den hier erhobenen murinen Daten deckt, bzw. bestätigt werden kann (O'Neil RG 1982).

Der I'_{sc} ist ein Parameter für den elektrogenen transzellulären Transport und beruht in seiner Berechnung auch auf V_{te} und R_{te} . Ein I'_{sc} von $55 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ wurde aus der schon erwähnten Studie aus isolierten Kaninchen-CD beschrieben und passt gut zu den hier ermittelten Werten (O'Neil RG 1982). Eine primäre Zellkultur aus PC zeigte allerdings nur einen I'_{sc} von $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, was mehrere Gründe haben kann (Husted, Hayashi et al. 1988). Zum einen zeigten die Zellkulturen auch nur ein V_{te} von um die -1 mV , zum anderen handelte es sich um papilläre CD, die im Gegensatz zu kortikalen CD nur wenig zum Na^+ -Transport beitragen. Eine weitere Studie aus M-1 CD-Zelllinien zeigte ein I'_{sc} von $-28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, wobei ein zugehöriger R_{te} von um $1000 \Omega\text{cm}^2$ den relativ geringen I'_{sc} erklärt (Thomas, Deetjen et al. 2001).

Die Werte aus den KO-Tieren zeigten im Vergleich zu den KT ähnliche Messwerte für V_{te} , R_{te} und I'_{sc} und es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen KT und KO (Abbildung 20). Einerseits scheint dies nachvollziehbar, da Claudine für die parazellulären und weniger die transzellulären Transporteigenschaften verantwortlich gemacht werden (Furuse, Fujita et al. 1998, Gunzel and Yu 2013). Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass die KO-Maus auch unter Normalbedingungen phänotypische Auffälligkeiten hat. Es wurden unter anderem ein erniedrigter Blutdruck, sowie ein renaler Cl^- -Verlust festgestellt (Gong, Yu et al. 2014). Somit würde auch ein erhöhter transzellulärer Ionentransport nicht unwahrscheinlich erscheinen, um durch verstärkte Resorption von Salz und Wasser den erniedrigten Blutdruck auszugleichen. Dies konnte anhand der hier erhobenen Daten unter SND allerdings nicht festgestellt werden. Dazu passt wiederum, dass Gong et al. bei der KO-Maus unter SND keine erhöhten Plasmakonzentrationen von Angiotensin-II oder Aldosteron feststellen konnten (Gong, Yu et al. 2014). Dies legt die Vermutung nahe, dass die KO-Maus mögliche Salzverluste nicht über den transzellulären Weg im CD kompensiert.

4.2.2 Effekt von Niedrig- Na^+ -Diät (NND) auf transzelluläre Transporteigenschaften

Im distalen Nephron und vor allem dem CD erfolgt die hormonell regulierte Einstellung des Elektrolythaushaltes (Pearce, Soundararajan et al. 2015). Die NND sollte dazu dienen, die

Transportprozesse im CD auch unter vermehrter Salzresorption und Aldosteronkontrolle zu untersuchen. Dazu wurde für sieben bis neun Tage eine NND an die Versuchstiere verfüttert (Zusammensetzung der Diäten siehe 2.1.4).

In KT und KO zeigte sich unter Na^+ -Mangel ein negativeres V_{te} als unter SND, und auch der Betrag des I'_{sc} war erhöht. Der R_{te} zeigte keine signifikanten Veränderungen zu den Werten unter der SND. In den KO-Mäusen waren V_{te} und I'_{sc} tendenziell noch höher als in KT (Abbildung 25), d. h. KO hatten keine Beeinträchtigung des stimulierten elektrogenen Salztransports.

Durch die Salzrestriktion wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert (Lorenz, Weihprecht et al. 1990, Crowley and Coffman 2012). Aldosteron ist der Hauptakteur, um den ENaC zu aktivieren. Ein negativeres V_{te} entspricht einer erhöhten Aktivität des ENaC, der Na^+ elektrogen resorbiert (Pearce, Soundararajan et al. 2015). Auch die Erhöhung des I'_{sc} unter Aldosteroneinfluss ist bekannt (Wang, Luo et al. 2020). Die Perfusion von Kaninchen-CD, die zuvor mit DOCA (Desoxycorticosteroneacetat), einer Vorstufe von Aldosteron, behandelt wurden, zeigten ebenfalls eine Zunahme im Betrag von V_{te} (Sansom and O'Neil 1985). Die Konzentration von Aldosteron im Plasma wurde in dieser Arbeit nicht gemessen, die gesteigerten transzellulären elektrogenen Transportparameter lassen aber den Schluss zu, dass die perfundierten cCD unter Aldosteronstimulation standen (Duong Van Huyen, Bens et al. 1998) und die Diät damit erfolgreich war.

Die tendenziell noch höheren transzellulären Transportparameter im KO erscheinen nicht verwunderlich. Schon unter SND konnte bei den KO-Tieren ein erniedriger Blutdruck und eine Hypochlorämie festgestellt werden (Gong, Yu et al. 2014). Unter NND dürfte sich dies noch verschärfen. Daher erscheint ein, im Vergleich zum KT, noch einmal verstärkter transzellulärer Rücktransport von NaCl im KO-CD notwendig, um durch eine ausreichende Kreislauffüllung den Blutdruck zu stabilisieren.

4.2.3 Erkenntnisse durch Hemmung des transzellulären Transportes

Bevor die parazellulären Eigenschaften gemessen werden konnten, musste der transzelluläre Transport gehemmt werden. Dazu wurde luminal eine Lösung mit 50 µM Amilorid und 100 µM HCT perfundiert. In KT und KO wurde daraufhin ein deutlicher Rückgang von V_{te} und I'_{sc} auf Werte um 0 beobachtet (Abbildung 20), und zwar sowohl unter SND als auch NND. Auch für R_{te} wurden Veränderungen beobachtet. Die Daten der SND-Messungen zeigten einen Anstieg von R_{te} in KT, im KO konnte jedoch kein Anstieg gemessen werden (Abbildung 20 B). Nach Fütterung der NND zeigte sich in KT erneut ein Anstieg von R_{te} nach Gabe von Amilorid und HCT, ähnlich dem Anstieg, der auch unter SND zu beobachten war. Der R_{te} der KO jedoch steigerte sich enorm und war sowohl höher als der von KO unter SND und auch als der KT unter NND (Abbildung 25 D).

Die beobachteten Rückgänge von V_{te} und I'_{sc} sind auf die hemmende Funktion von Amilorid auf den dafür hochsensitiven ENaC zurückzuführen (Canessa, Schild et al. 1994). Daten aus CD-Zellkultur decken sich mit den hier ermittelten Daten. Ein V_{te} von -59,5 mV im Mittel (nach Aldosteroninkubation) wurde durch Amilorid auf durchschnittlich -6,7 mV gesenkt. Die Konzentration betrug 1 µM. Für Konzentrationen von 10 µM wurde ein noch größerer Rückgang von V_{te} und wurden sogar positive Werte beschrieben (Gross, Minuth et al. 1986). In dieser Arbeit wurde eine Konzentration von 50 µM Amilorid verwendet. Der Betrag von V_{te} wurde sehr deutlich gesenkt und lag meist zwischen -1 und 0 mV, teilweise wurden ebenfalls positive Werte beobachtet. Auch Daten aus der CD-Perfusion von Kaninchen decken sich mit den hier erhobenen Werten und zeigen eine Hemmung der Na^+ -Resorption und der K^+ -Sekretion. Zudem wird auch dort die Umkehr zu positiven Werten von V_{te} beschrieben (Stoner, Burg et al. 1974). Die Konzentration von 50 µM wurde gewählt, um eine möglichst vollständige Hemmung des ENaC zu erreichen. In CD-Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition bei 0,22 µM Amilorid von fünfzig Prozent besteht (Letz, Ackermann et al. 1995). Die hier gewählte Konzentration kann somit als supramaximal angesehen werden.

Neben den Hauptzellen sind neueren Erkenntnissen zufolge auch Schaltzellen am transzellulären Na^+Cl^- -Transport beteiligt (siehe 1.3). Experimentell zeigte sich, dass dieser mit 100 µM HCT gehemmt werden konnte (Eladari and Hubner 2011). Daher wurden in den hier durchgeföhrten Experimenten, zusätzlich zu Amilorid, auch 100 µM HCT luminal appliziert. Im Unterschied zu der Na^+ -Resorption durch den ENaC ist dieser Transport zwar nicht elektrogen,

ihm liegt aber eine bestimmte Permeabilität der Zellmembran für Ionen zu Grunde. Die elektrophysiologischen Messungen des parazellulären Weges erfordern jedoch idealerweise eine Ausschaltung dieser Membranpermeabilität. Aus diesem Grund erschien eine Hemmung für die Bestimmung der parazellulären Leitfähigkeiten sinnvoll.

Prinzipiell anzumerken ist, dass durch eine Hemmung des transzellulären Transportes möglicherweise auch parazelluläre Eigenschaften verändert werden können. In diesen ersten akuten Messungen haben wir die parazellulären Eigenschaften jedoch möglichst direkt nach Gabe der luminalen Inhibitoren gemessen und damit zumindest solche Regulationsprozesse ausgeschlossen, die eine bestimmte Latenz, z. B. durch sekundär bedingte Proteinmodifikationen besitzen.

4.3 Parazelluläre Transporteigenschaften des kortikalen Sammelrohres (cCD)

4.3.1 Chloridselektivität des Sammelrohres (CD) in Kontrollen (KT)

Nach der zuvor beschriebenen Hemmung des transzellulären Transportes erfolgte der Austausch der basolateralen Kontrolllösung mit einer 30 mM NaCl-Lösung um ein DP zu erzeugen. Das daraus berechnete $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$ lag bei $1,30 \pm 0,06$ entsprechend einer Anionenselektivität. P_{Cl} und P_{Na} zeigten eine große interindividuelle Variabilität. Vereinzelt wurden auch negative DP gemessen und eine dementsprechende Kationenselektivität, z. B. $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}} 0,8$ festgestellt.

Auch in der Literatur existieren Daten zur CD-Perfusion von *Warden et al.*, welche über eine Anionenselektivität ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ 0,55 bis 0,82) berichten (Warden, Schuster et al. 1988). In Zelllinien, die aus CD etabliert wurden, zeigte sich ebenfalls eine geringe Anionenselektivität (Fan, Tatum et al. 2019). In anderen CD-Zellkulturen (M1 und mIMCD3, *mouse inner medullary collecting duct* / Maus Inneres Mark Sammelrohr) zeigte sich die hier zum Teil beobachtete Kationenselektivität (Hou, Renigunta et al. 2010). Perfusionsdaten, die ebenfalls von einer Kationenselektivität berichten, sind nicht bekannt.

Zuletzt sollte auch die hier beobachtete Korrelation von V_{te} und $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$ (3.1.3) beachtet werden. Wenn unter Normalbedingungen eine Regulation in Abhängigkeit an V_{te} erfolgt und bei geringem elektrogenen Na^+ -Transport über ENaC eine Kationenselektivität vorliegt, wäre

auch an eine *backflow*-Kationenselektivität, im Sinne einer Na^+ -Sekretion nicht ausgeschlossen. *Morla et al.* haben diese neuartige Sekretion des CD beschrieben (Morla, Doucet et al. 2016).

Die Daten legen insgesamt nahe, dass das CD, im Gegensatz zur Darstellung in den Lehrbüchern, nicht allein über eine rein statische parazelluläre P_{Cl} verfügt. Vielmehr scheint hier ein regulatorischer Ansatz auf der Ebene der TJ zu bestehen, die Balance zwischen Na^+ Resorption, Cl^- -Resorption und K^+ -Sekretion dem individuellen Bedarf anzupassen. Das Spektrum würde dann, neben der klassischen Na^+Cl^- -Resorption auch einen Rückstrom von Na^+ und damit eine vorwiegende Cl^- -Resorption mit K^+ -Sekretion zulassen. Dies könnte einer hypochlorämischen und hyperkaliämischen Elektrolytstörung entgegenwirken, die z. B. bei Azidose auftritt.

4.3.2 Erkenntnisse durch Claudin-4-Defizienz (KO)

In den gleichen Messungen (4.3.1) mit KO-cCD zeigte sich ein niedrigeres DP. $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$ lag bei $1,02 \pm 0,03$. Dies entspricht einem unselektiven parazellulären Weg. Die Verringerung von $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$ im Gegensatz zu KT wurde durch eine erhöhte absolute P_{Na} verursacht. P_{Cl} zeigte keine signifikante Abweichung. Der in diesem Abschnitt des Experimentes vorwiegend parazellulär bestimmte R_{te} ist bei der Betrachtung der absoluten Permeabilitäten wichtig, da er direkten Einfluss auf jeweils beide Größen hat. Der R_{te} war in KO verringert und betrug $112,5 \pm 7,85 \Omega\text{cm}^2$ (zum Vergleich: KT R_{te} : $150,6 \pm 11,18 \Omega\text{cm}^2$). Aus dieser Perspektive hätte Claudin-4 in der TJ also eine abdichtende Funktion gegenüber Kationen.

Bisher existieren keine weiteren Perfusionsmessungen von Claudin-4 defizienten CD, weshalb nur ein Vergleich mit Daten aus Zellkultur möglich ist. In diesen fand meist eine Überexpression oder ein *knockdown* von Claudin-4 statt, der parazelluläre Veränderungen nach sich zog.

Wie auch in den hier erhobenen Daten konnten *Van Itallie et al.* eine Veränderung von P_{Na} zeigen. In einer Zellkultur mit niedrigem R_{te} und Na^+ -Selektivität (MDCKII - Madin-Darby canine kidney II) wurde durch Überexpression von Claudin-4 der R_{te} erhöht, sowie P_{Na} gesenkt, während keine Änderung von P_{Cl} beobachtet wurde (Van Itallie, Rahner et al. 2001). Passend dazu wurde hier durch KO P_{Na} erhöht und ein erniedrigter R_{te} gemessen. *Lashhab et al.* bestätigen diese Daten und beobachteten in MDCK I Claudin-4 *knockdown* Zellen zusätzlich zu

dem erniedrigten TER und der erhöhten P_{Na} auch noch eine erhöhte P_{Cl} (Lashhab, Rumley et al. 2019).

Hou et al. nutzten M1 und mIMCD3 Zellkulturen für den *knockdown* von Claudin-4. Auch dort wurden Änderungen der parazellulären Eigenschaften festgestellt. Es zeigte sich jedoch ein Anstieg des TER. Verantwortlich dafür wurde eine Verminderung von P_{Cl} diskutiert, während für P_{Na} keine signifikante Änderung zu beobachten war (Hou, Renigunta et al. 2010).

4.3.3 Einfluss einer Niedrig-Na⁺-Diät (NND) auf parazelluläre Eigenschaften

Nach sieben bis neun Tagen NND und somit unter Aldosteroneinfluss wurden die parazellulären Eigenschaften erneut gemessen. Die Frage war, ob die parazelluläre Leitfähigkeit von Cl⁻ verändert ist, um zusätzlich zur bekannten Steigerung der Na⁺-Resorption auch die parazelluläre Resorption von Cl⁻ zu verstärken. In KT zeigten sich im Vergleich zu den Messungen unter SND keine Veränderungen der parazellulären Eigenschaften. In den KO fiel vor allem ein deutlich erhöhter R_{te} (unter Amilorid/HCT) von circa 200 Ωcm^2 auf. Dementsprechend waren die absoluten P_{Cl} und P_{Na} erniedrigt. Der Unterschied in P_{Cl}/P_{Na} zwischen KT und KO bestand unter NND weiterhin (KT: $1,24 \pm 0,05$; KO: $0,97 \pm 0,02$). Aus diesem Blickwinkel würde Claudin-4 der TJ unter NND also eine P_{Cl} verleihen.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass durch Aldosteron eine Phosphorylierung von Claudin-4 herbeigeführt wird und sich dadurch der R_{te} verringert sowie die Cl⁻-Leitfähigkeit erhöht (Le Moellic, Boulkroun et al. 2005). Diese Veränderungen der parazellulären Eigenschaften konnten hier in KT nicht nachvollzogen werden. Die Beobachtungen in KO geben aber in gewisser Weise ein Spiegelbild wieder. Methodische Unterschiede bestehen allerdings darin, dass dort nur die erste Stunde der Aldosteronwirkung beobachtet wurde, während hier eine 8- bis 9-tägige diätetische Aldosteronerhöhung erzeugt wurde. So konnten *Sansom et al.* sogar eine generelle Senkung der parazellulären Leitfähigkeit nach 14-tägiger Mineralkortikoidbehandlung in cCD feststellen (Sansom and O'Neil 1985).

Neben Aldosteron sind weitere Möglichkeiten der TJ-Regulation gegeben.

So konnte im Innenohr eine Translokation von Claudin-4 durch ADH beobachtet werden (Runggaldier, Pradas et al. 2017). Durch einen niedrigen Blutdruck könnte ADH auch unter NND ausgeschüttet werden. Seine bislang vor allem bekannte Funktion im CD ist die Wirkung

über den V2-Rezeptor, der zum Einbau von AQP 2 führt (Nielsen, Chou et al. 1995, Nielsen, Frokiaer et al. 2002).

In mCD konnte für Claudin-19 auch eine Relokation in intrazelluläre Vesikel durch verschiedene Osmolalitäten beschrieben werden (Ziemens, Sonntag et al. 2019). In dieser Arbeit wurden zwar alle Lösungen auf eine Osmolalität von 300 mosm/l eingestellt, jedoch können durchaus Unterschiede in der Urinosmolarität der Tiere zwischen SND und NND bestanden haben, die eine weitere Veränderung der TJ nach sich gezogen haben (Gong, Yu et al. 2014).

4.3.4 Einfluss einer Niedrig-Cl⁻-Inkubation auf parazelluläre Eigenschaften in Abhängigkeit von Claudin-4

In den Versuchen der Niedrig-Cl⁻-Inkubation sollte untersucht werden, ob sich eine niedrige Cl⁻-Konzentration im Blut bzw. in der basolateralen Perfusionslösung auf die Permeabilitätseigenschaften der TJ auswirkt. Die hier erhobenen Daten, insbesondere die DP, wurden nach 15-minütiger Inkubation entweder mit Kontrolllösung oder Niedrig-Cl⁻-Lösung ermittelt und werden daher nicht statistisch mit den anderen Daten dieser Arbeit verglichen.

Vor der Inkubationsphase zeigten sich ähnliche Ausgangsbedingungen in allen Gruppen im Hinblick auf V_{te} , I'_{sc} und R_{te} (Abbildung 28). Überraschenderweise konnte hier ein starker Einfluss der Inkubation mit Niedrig-Cl⁻-Lösung in KT beobachtet werden, der in KO nicht vorhanden war. KT-cCD, die mit Niedrig-Cl⁻-Lösung inkubiert wurden, zeigten ein deutlich positiveres DP, entsprechend einer Anionenselektivität, als nach Inkubation mit Kontrolllösung (Abbildung 31 A). Der R_{te} nach Inkubation war erniedrigt (Abbildung 29), während P_{Cl} erhöht und P_{Na} unverändert war (Abbildung 31C und D). Da diese Veränderungen in KO-CD nicht beobachtet wurden (Abbildung 31B), könnte dies für eine Bereitstellung von parazellulärer P_{Cl} in Abhängigkeit von Claudin-4 sprechen. Als posttranskriptionale Effektormechanismen kämen z. B. die Translokation von Claudin-4 in die TJ oder die Phosphorylierung von Claudin-4 in der TJ in Frage. Eine Veränderung durch Expression ist nach nur 15-minütiger Inkubation nicht zu erwarten. Interessant ist nun, welcher Signalweg die Information der Cl⁻-Konzentration in die TJ trägt.

In der Literatur wurde beschrieben, dass die WNK eine Bindungsstelle für Cl⁻ nahe des katalytischen Zentrums besitzen und so als Cl⁻-Sensor fungieren könnten (Ponce-Coria, San-Cristobal et al. 2008, Chen, Lo et al. 2019). Theoretisch erscheint es sinnvoll auch im CD bei niedrigem Cl⁻-Gehalt im Plasma P_{Cl} zu erhöhen, um mehr Cl⁻ zu resorbieren.

Die hier erzielten Ergebnisse geben somit Anhalt für die Annahme, dass die basolaterale bzw. plasmaseitige Cl⁻-Konzentration die parazellulären Eigenschaften des cCD zusätzlich zu den schon bekannten Einflüssen auf zelluläre Transporter wie NKCC2 (Na⁺-K⁺-2 Cl⁻-Kotransporter) und den Na⁺-K⁺-Kotransporter reguliert (Ponce-Coria, San-Cristobal et al. 2008, Bazua-Valenti, Rojas-Vega et al. 2018) und dass Claudin-4 an der Erzeugung dieser Anionenselektivität beteiligt ist.

In der Literatur ist beschrieben, dass WNK4 Claudin-4 phosphoryliert (Yamauchi, Rai et al. 2004). Die hier gemessene Permeabilitätsveränderung könnte also über WNK4 erfolgt sein. Dies würde die vorhandenen Daten bestätigen, die einen Cl⁻-sensing-Mechanismus der WNK vorschlagen (Chen, Lo et al. 2019). Auch die gemessenen Veränderungen der parazellulären Eigenschaften decken sich mit den Daten aus Zellkulturen, die nach induzierter Expression von WNK4 sowohl einen niedrigeren R_{te} als auch eine erhöhte P_{Cl} zeigen (Kahle, Macgregor et al. 2004).

Die Erkenntnisse aus den Messungen ohne Inkubation unter SND (siehe 3.2.2) zeigen, dass Claudin-4 eher abdichtende Funktion gegenüber Na⁺ hat, was auch von einigen anderen Autoren so beschrieben wird (Le Moellic, Boulkroun et al. 2005). Die hier nach Inkubation gemessenen Veränderungen (erniedrigter R_{te}, erhöhte absolute P_{Cl}, unveränderte P_{Na}, Abbildung 29 & Abbildung 31C&D) lassen zusätzlich den Schluss zu, dass sich ein kanalbildendes denn ein abdichtendes Geschehen abspielt. In der Literatur wird auch diese Eigenschaft Claudin-4 zugeschrieben (Hou, Renigunta et al. 2010). Sollte WNK4 Claudin-4 phosphoryliert haben, wäre zu überlegen, ob Claudin-4 im phosphorylierten Zustand eher kanalbildende (gegenüber Cl⁻) und im Normalzustand eher abdichtende Eigenschaften (gegenüber Na⁺) annehmen kann.

In dieser Arbeit wurden funktionelle Daten erhoben. Ein definitiver Nachweis, ob nach 15-minütiger Cl⁻-Inkubation mehr Claudin-4 im phosphorylierten Zustand vorliegt, wäre nur mit Hilfe von zusätzlichen Methoden wie Antikörperfärbungen möglich gewesen. Ein Antikörper gegen phosphoryliertes Claudin-4 war jedoch nicht verfügbar. Diskussionswürdig

ist zudem, ob die gemessenen Veränderungen durch Claudin-4 alleine bedingt werden. Es ist naheliegend, dass die beobachtete Veränderung auch durch weitere posttranskriptionale Regulationen an anderen Claudinen vermittelt wird.

Anzumerken ist, dass die Streuung der Daten in der Reihe der Inkubationsmessung relativ groß war, was auch an der geringeren Anzahl an Experimenten liegt. Zudem ist verwunderlich, dass die Permeabilität der KT-cCD, welche mit Kontrolllösung inkubiert wurden, bei P_{Cl}/P_{Na} bei $1,12 \pm 0,06$ lag. Dies ist deutlich weniger Cl⁻-selektiv als die KT in den Messungen ohne Inkubation zeigten ($P_{Cl}/P_{Na} 1,30 \pm 0,06$). Zu diskutieren wäre, ob auch die Inkubation mit der Kontrolllösung einen Effekt auf die funktionellen Zustände der TJ und Claudine haben könnte. So konnte in KO-cCD nach Inkubation sowohl mit Kontrolllösung als auch Niedrig-Cl⁻-Lösung eine Anionenselektivität beobachtet werden ($P_{Cl}/P_{Na} 1,28 \pm 0,11$ und $1,27 \pm 0,10$). So scheint es, dass auch andere von Claudin-4 unabhängige Faktoren eine Anionenselektivität vermitteln können und Claudin-4 zumindest nicht allein dafür verantwortlich gemacht werden kann.

Kritisch hinterfragen kann man dabei den Cl⁻-Gehalt von 145 mM in der Kontrolllösung statt eigentlich 120 mM im humanen Plasma, da normalerweise 25 mM Bikarbonat als Anion zu Na⁺ vorliegen. Da in dieser Arbeit alle Lösungen mit Phosphat gepuffert waren, wurden 145 mM NaCl eingesetzt, d.h. die Kontrollbedingungen entsprachen bereits einer „Hyperchlorämie“. Eventuell könnte es sinnvoll sein, weitere Messungen mit einer durch Bikarbonat gepufferten Lösung durchzuführen.

4.4 Physiologische Relevanz

Diese Arbeit zeigt, dass der CD ein sehr heterogenes Epithel mit hoher Plastizität ist. So wurde hier eine große interindividuelle Variabilität der transzellulären Transporteigenschaften des CD festgestellt. Neue Erkenntnisse bestätigen diesen Individualismus. So sind zum Beispiel einige CD auf Na⁺ Resorption „spezialisiert“, andere wiederum resorbieren speziell Wasser (Himmerkus, Svendsen et al. 2020). Auch parazellulär zeigte sich eine große Bandbreite die von Anionen- bis zu Kationenselektivität reichte und eine Charakterisierung von „dem einen“ CD unmöglich machte.

Der R_{te} in KO war niedriger. Die P_{Na} der TJ war erhöht, während P_{Cl} nicht signifikant abwich. So scheint Claudin-4 hier unter Normalbedingungen eine abdichtende Funktion gegenüber

Kationen anzunehmen. Diese Beobachtung wird durch *Van Itallie et al.* und *Lashhab et al.* unterstützt (Van Itallie, Rahner et al. 2001, Lashhab, Rumley et al. 2019).

Nach Niedrig-Cl-Inkubation konnte in KT, nicht jedoch in KO, eine erhöhte P_{Cl} , sowie ein erniedrigter R_{te} beobachtet werden, was wiederum für Cl⁻-Kanal-bildende Eigenschaften spricht. Da diese nur in KT beobachtet wurden, scheint es, als seien diese von Claudin-4 abhängig. *Hou et al.* konnten durch *knockdown* von Claudin-4 in Zellkultur feststellen, dass P_{Cl} erniedrigt und der TER erhöht war und Claudin-4 auch dort als Anionenkanal fungierte (Hou, Renigunta et al. 2010).

Nimmt man die Ergebnisse zusammen, kann Claudin-4 die Anionenselektivität anscheinend sowohl durch abdichtende Eigenschaften gegenüber Na⁺, als auch durch permeabilitätsvermittelnde, also kanalbildende Eigenschaften gegenüber Cl⁻ erzeugen. Letztlich erklärt diese Beobachtung teilweise die „uneinheitliche“ Literatur bezüglich Claudin-4. So vermittelt Claudin-4 sowohl eine Barriere-, als auch eine Kanalfunktion.

In diesem Zusammenhang ist die Interaktion von Claudinen zu nennen. Wie in (1.4) beschrieben, interagieren Claudine derselben Zelle in *cis* und mit gegenüberliegenden Zellen in *trans* Formation (Van Itallie, Mitic et al. 2011). Die *trans* Interaktion von Claudin-4 und -8 ist in der Literatur beschrieben. Diese sei für den beschriebenen Cl-Kanal verantwortlich (Hou, Renigunta et al. 2010). Neben der sehr hohen Affinität zwischen Claudin-4 und Claudin-8, zeigte sich auch eine Affinität von Claudin-4 für Claudin-3 oder Claudin-7 (Hou, Renigunta et al. 2010). Es wäre durchaus möglich, dass die beobachteten Funktionen von Claudin-4, das Abdichten gegenüber Na⁺ und das Öffnen gegenüber Cl⁻, von der Interaktion mit weiteren Claudinen abhängt.

Neben der Interaktion spielt auch der Phosphorylierungszustand von Claudinen eine Rolle. WNK4 kann Claudin-4 phosphorylieren und P_{Cl} verändern (Yamauchi, Rai et al. 2004). Zusätzlich fungiert WNK4 als Cl⁻-Sensor (Chen, Lo et al. 2019), was eine Beteiligung in den Experimenten der Cl⁻ Inkubationsreihe wahrscheinlich macht. So könnte auch eine Phosphorylierung von Claudin-4 die beobachteten kanalbildenden Eigenschaften bedingen.

Die tendenzielle Erhöhung des Transportes, vor allem aber der sehr hohe R_{te} der KO-Maus unter NND, sprechen dafür, dass das System durch den Verlust von Claudin-4 im KO ineffizient ist. Dies zeigt die gewichtige Stellung von Claudin-4 im parazellulären Transportsystem des CD.

Schon unter SND konnte bei den KO-Tieren ein erniedrigter Blutdruck, eine Hypochlorämie und eine metabolische Alkalose festgestellt werden (Gong, Yu et al. 2014). Unter NND dürfte sich dies noch verschärft haben. Daher wird verstärkter transzellulärer Transport betrieben, um Salz und Wasser im Körper zu halten.

Wenn Claudin-4 wie zuvor beschrieben unter Normalbedingungen eine abdichtende Funktion gegenüber Na^+ innehält und diese in KO wegfällt, kann es zu einem retrograden Verlust von Na^+ und sekundär wohl auch von Wasser kommen. Vermutlich handelt es sich demnach bei dem stark erhöhten R_{te} um eine Beobachtung infolge sekundärer Hochregulation von weiteren abdichtenden Claudinen, um Extrazellularvolumen und Blutdruck zu stabilisieren. Durch diese Hochregulation würde zwar parazellulärer Transport vermindert, jedoch wiegt der mögliche *backflow* (Rückstrom über die TJ in das Tubuluslumen) von Na^+ wohl schwerer. In Frage kommt Claudin-8, da eine Hochregulation durch Aldosteron im Darm zur Verhinderung des *backflows* vorbeschrieben ist (Amasheh, Milatz et al. 2009). Diese hier beobachtete Anpassung der TJ zeigt die Plastizität der TJ auf Expressionsebene bzw. der Translokation von intrazellulär vorliegenden Claudinen in die TJ auf.

4.5 Ausblick

Im Forschungsfeld der Claudine konnten in den letzten Jahren zahlreiche Aspekte aufgeklärt werden. Die einzelnen Claudine wurden detailliert charakterisiert und ihre Expression in verschiedenen Epithelen gezeigt. Die Regulation und Plastizität der TJ ist noch deutlich komplexer und ein bislang noch unzureichend verstandenes Feld. In dieser Arbeit konnte die Charakterisierung von Cladin-4 vorangetrieben und die CD-TJ charakterisiert werden, jedoch bleiben auch offene Fragen.

Es wäre sehr hilfreich, die erhobenen funktionellen Daten mit Expressionsanalysen zu korrelieren. Die Annahme, dass nach NND in KO sekundär abdichtende Claudine exprimiert werden, scheint naheliegend. Antikörperfärbungen könnten zeigen, wie sich das TJ-Muster durch die NND verändert.

Der Frage, ob eine Phosphorylierung von Cladin-4 die kanalbildenden Eigenschaften bedingt, könnte nachgegangen werden, indem Färbungen auf phosphoryliertes Cladin mit der hier

erfolgten Niedrig-Cl⁻-Inkubation verknüpft werden. Auch weitere Claudine könnten dann auf ihren Phosphorylierungszustand hin untersucht werden.

Beachtenswert ist auch die These, dass WNK4 als molekularer Schalter zwischen einer NaCl Resorption über den Na⁺-Cl⁻-Kotransporter im DCT und der an eine K⁺-Sekretion gekoppelten NaCl Resorption im CD fungieren könnte. So würde sich auch eine experimentell veränderte K⁺ Konzentration anbieten, die Funktion von WNK im CD weiter zu untersuchen.

Zuletzt könnten auch luminal niedrigere NaCl Konzentrationen angewendet werden, um auch die Komponente von basolateral nach luminal des Ionentransportes weiter zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Im Sammelrohr (CD) der Niere findet die Feineinstellung der Ausscheidung von Elektrolyten und Wasser statt. Erkrankungen des Menschen mit Elektrolytentgleisung, wie einige Formen der metabolischen Azidose, der Hypokaliämie oder der arteriellen Hypertonie haben ihren pathophysiologischen Ursprung in diesem Abschnitt des Nephrons.

Die Hauptzellen des Sammelrohr resorbieren luminales Na^+ durch den epithelialen Natriumkanal (ENaC), angetrieben durch die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase und einen zellulären K^+ -Ausstrom. Hierdurch entsteht ein lumennegatives transepitheliales Potenzial. Dieses Potenzial sorgt nach allgemeiner Lehrmeinung dafür, dass das Anion Cl^- einen parazellulären Weg über die *Tight Junctions* (TJ) zwischen den Zellen einschlagen kann. Die Voraussetzung ist eine selektive Leitfähigkeit der *Tight Junctions* für Cl^- .

Claudine sind Proteine der *Tight Junctions*, die für deren Dichtigkeit und Selektivität verantwortlich sind. Im Sammelrohr ist unter anderem Claudin-4 exprimiert. Für diese Arbeit standen durch eine Kooperation mit der Washington Universität in St. Louis (USA) Claudin-4 defiziente Mäuse (KO) zur Verfügung, deren parazelluläre Eigenschaften des Sammelrohrs durch die *in-vitro* Perfusion untersucht wurde.

Nach Hemmung des transzellulären Transportes wurden Ionendiffusionspotenziale erzeugt und gemessen, die Rückschlüsse auf die parazelluläre Permeabilität zuließen. Kontrolltiere zeigten hier vornehmlich eine Anionenselektivität, die in den Claudin-4 defizienten Tieren nicht beobachtet wurde. Dies wurde auf eine abdichtende Funktion gegenüber Na^+ von Claudin-4 zurückgeführt.

Die Regulation des parazellulären Weges geschieht über die Expression, Translokation und funktionelle Regulation von Claudinen. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren erhöhte sich der parazelluläre Widerstand der Claudin-4 defizienten Maus unter einer salzarmen Diät (NND) deutlich. Eine Erklärung wäre die Funktion von Claudin-4 als Chloridkanal oder die Funktion anderer abdichtender Claudine, die nun in Abwesenheit von Claudin-4 in die *Tight Junction* eingebaut werden.

Nach Inkubation mit chloridarmer Lösung zeigte sich eine Erhöhung der Anionenselektivität des parazellulären Weges, die nur in Claudin-4 exprimierenden Sammelrohren, nicht aber in Claudin-4 defizienten Sammelrohren beobachtet wurde. Auch diese Beobachtung wäre mit einer Funktion von Claudin-4 als ein Chloridkanal vereinbar.

Faszinierender Weise scheint Claudin-4 sowohl an der Barrierefunktion, als auch an der Bildung einer Cl^- Permeabilität beteiligt zu sein. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass dies vom Funktionszustand des Sammelrohrs abhängt und über die Cl^- Konzentration beeinflusst wird.

6 Literatur

- Abate, G., P. Comella, A. Marfella, G. Santelli, F. Nitsch, M. Fiore and M. Perna (1989). "Prognostic relevance of urinary neopterin in non-Hodgkin's lymphomas." Cancer **63**(3): 484-489.
- Agarwal, R., T. D'Souza and P. J. Morin (2005). "Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity." Cancer Res **65**(16): 7378-7385.
- Akasaka, H., F. Sato, S. Morohashi, Y. Wu, Y. Liu, J. Kondo, H. Odagiri, K. Hakamada and H. Kijima (2010). "Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifen-treated human breast cancer MCF-7 cells." BMC Cancer **10**: 548.
- Alexandre, M. D., B. G. Jeanssonne, R. H. Renegar, R. Tatum and Y. H. Chen (2007). "The first extracellular domain of claudin-7 affects paracellular Cl⁻ permeability." Biochem Biophys Res Commun **357**(1): 87-91.
- Alparslan, C., E. P. Öncel, S. Akbay, D. Alaygut, F. Mutlubaş, M. Tatlı, M. Konrad, Ö. Yavaşcan and B. Kasap-Demir (2018). "A novel homozygous W99G mutation in CLDN-16 gene causing familial hypomagnesemic hypercalciuric nephrocalcinosis in Turkish siblings." Turk J Pediatr **60**(1): 76-80.
- Amasheh, S., S. Milatz, S. M. Krug, M. Bergs, M. Amasheh, J. D. Schulzke and M. Fromm (2009). "Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation." Biochem Biophys Res Commun **378**(1): 45-50.
- Amasheh, S., S. Milatz, S. M. Krug, A. G. Markov, D. Gunzel, M. Amasheh and M. Fromm (2009). "Tight junction proteins as channel formers and barrier builders." Ann N Y Acad Sci **1165**: 211-219.
- Asensio Sanchez, V. M., C. Perna Monroy and P. Perez Alonso (2004). "[Cholesterol granuloma of the choroid simulating a macular tumor]." Arch Soc Esp Oftalmol **79**(9): 453-455.
- Assaykeen, T. A., R. A. Castellino, T. A. Love and T. A. Stamey (1971). "Peripheral and renal vein renin activity. Effect of postural stimulation in normotensive healthy adults." Arch Intern Med **128**(3): 378-379.
- Barry, P. H. and J. W. Lynch (1991). "Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis." J Membr Biol **121**(2): 101-117.
- Basler, K. and J. M. Brandner (2017). "Tight junctions in skin inflammation." Pflugers Arch **469**(1): 3-14.
- Bazua-Valenti, S., L. Rojas-Vega, M. Castaneda-Bueno, J. Barrera-Chimal, R. Bautista, L. G. Cervantes-Perez, N. Vazquez, C. Plata, A. R. Murillo-de-Ozores, L. Gonzalez-Mariscal, D. H. Ellison, D. Riccardi, N. A. Bobadilla and G. Gamba (2018). "The Calcium-Sensing Receptor Increases Activity of the Renal NCC through the WNK4-SPAK Pathway." J Am Soc Nephrol **29**(7): 1838-1848.
- Bindels, R. J. (2003). "A molecular switch controlling renal sodium and potassium excretion." Nat Genet **35**(4): 302-303.
- Blaine, E. H., J. O. Davis and R. T. Witty (1970). "Renin release after hemorrhage and after suprarenal aortic constriction in dogs without sodium delivery to the macula densa." Circ Res **27**(6): 1081-1089.
- Boone, M. and P. M. Deen (2008). "Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption." Pflugers Arch **456**(6): 1005-1024.

Bourque, C. W., S. H. Oliet and D. Richard (1994). "Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation." *Front Neuroendocrinol* **15**(3): 231-274.

Brandes, L., Schmidt (2019). *Physiologie des Menschen*. Berlin, Springer Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature

Breiderhoff, T., N. Himmerkus, M. Stuiver, K. Mutig, C. Will, I. C. Meij, S. Bachmann, M. Bleich, T. E. Willnow and D. Müller (2012). "Deletion of claudin-10 (Clnd10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(35): 14241-14246.

Brown, D., S. Hirsch and S. Gluck (1988). "An H⁺-ATPase in opposite plasma membrane domains in kidney epithelial cell subpopulations." *Nature* **331**(6157): 622-624.

Burg, M. B., L. Issaacson, J. Grantham and J. Orloff (1968). "Electrical properties of isolated perfused rabbit renal tubules." *Am J Physiol* **215**(4): 788-794.

Canessa, C. M., L. Schild, G. Buell, B. Thorens, I. Gautschi, J. D. Horisberger and B. C. Rossier (1994). "Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits." *Nature* **367**(6462): 463-467.

Cheema, M. U., D. L. Irsik, Y. Wang, W. Miller-Little, K. A. Hyndman, E. S. Marks, J. Frokiaer, E. I. Boesen and R. Norregaard (2015). "Estradiol regulates AQP2 expression in the collecting duct: a novel inhibitory role for estrogen receptor alpha." *Am J Physiol Renal Physiol* **309**(4): F305-317.

Chen, J. C., Y. F. Lo, Y. W. Lin, S. H. Lin, C. L. Huang and C. J. Cheng (2019). "WNK4 kinase is a physiological intracellular chloride sensor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**(10): 4502-4507.

Chiba, H., M. Osanai, M. Murata, T. Kojima and N. Sawada (2008). "Transmembrane proteins of tight junctions." *Biochim Biophys Acta* **1778**(3): 588-600.

Choate, K. A., K. T. Kahle, F. H. Wilson, C. Nelson-Williams and R. P. Lifton (2003). "WNK1, a kinase mutated in inherited hypertension with hyperkalemia, localizes to diverse Cl⁻ -transporting epithelia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 663-668.

Claude, P. and D. A. Goodenough (1973). "Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia." *J Cell Biol* **58**(2): 390-400.

Crowley, S. D. and T. M. Coffman (2012). "Recent advances involving the renin-angiotensin system." *Exp Cell Res* **318**(9): 1049-1056.

Cullen-McEwen, L. A., M. M. Kett, J. Dowling, W. P. Anderson and J. F. Bertram (2003). "Nephron number, renal function, and arterial pressure in aged GDNF heterozygous mice." *Hypertension* **41**(2): 335-340.

Davis, J. O. and R. H. Freeman (1976). "Mechanisms regulating renin release." *Physiol Rev* **56**(1): 1-56.

Duong Van Huyen, J., M. Bens and A. Vandewalle (1998). "Differential effects of aldosterone and vasopressin on chloride fluxes in transimmortalized mouse cortical collecting duct cells." *J Membr Biol* **164**(1): 79-90.

Ebnet, K., A. Suzuki, S. Ohno and D. Vestweber (2004). "Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions?" *J Cell Sci* **117**(Pt 1): 19-29.

Eladari, D., R. Chambrey and J. Peti-Peterdi (2012). "A new look at electrolyte transport in the distal tubule." *Annu Rev Physiol* **74**: 325-349.

Eladari, D. and C. A. Hubner (2011). "Novel mechanisms for NaCl reabsorption in the collecting duct." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **20**(5): 506-511.

Fan, J., R. Tatum, J. Hoggard and Y. H. Chen (2019). "Claudin-7 Modulates Cl(-) and Na(+) Homeostasis and WNK4 Expression in Renal Collecting Duct Cells." *Int J Mol Sci* **20**(15).

Farquhar, M. G. and G. E. Palade (1963). "Junctional complexes in various epithelia." *J Cell Biol* **17**: 375-412.

Fejes-Toth, G. and A. Naray-Fejes-Toth (1992). "Differentiation of renal beta-intercalated cells to alpha-intercalated and principal cells in culture." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12): 5487-5491.

Fraser, R., J. J. Brown, A. F. Lever, P. A. Mason and J. I. Robertson (1979). "Control of aldosterone secretion." *Clin Sci (Lond)* **56**(5): 389-399.

Fujita, H., Y. Hamazaki, Y. Noda, M. Oshima and N. Minato (2012). "Claudin-4 deficiency results in urothelial hyperplasia and lethal hydronephrosis." *PLoS One* **7**(12): e52272.

Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto and S. Tsukita (1998). "Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin." *J Cell Biol* **141**(7): 1539-1550.

Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura and S. Tsukita (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." *J Cell Biol* **123**(6 Pt 2): 1777-1788.

Furuse, M., H. Sasaki and S. Tsukita (1999). "Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands." *J Cell Biol* **147**(4): 891-903.

Goldman, D. E. (1943). "POTENTIAL, IMPEDANCE, AND RECTIFICATION IN MEMBRANES." *The Journal of General Physiology* **27**(1): 37-60.

Gong, Y., J. Wang, J. Yang, E. Gonzales, R. Perez and J. Hou (2015). "KLHL3 regulates paracellular chloride transport in the kidney by ubiquitination of claudin-8." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(14): 4340-4345.

Gong, Y., M. Yu, J. Yang, E. Gonzales, R. Perez, M. Hou, P. Tripathi, K. S. Hering-Smith, L. L. Hamm and J. Hou (2014). "The Cap1-claudin-4 regulatory pathway is important for renal chloride reabsorption and blood pressure regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(36): E3766-3774.

Gordon, R. D. (1986). "The syndrome of hypertension and hyperkalemia with normal glomerular filtration rate: Gordon's syndrome." *Aust N Z J Med* **16**(2): 183-184.

Greger, R. (1981). "Cation selectivity of the isolated perfused cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney." *Pflugers Arch* **390**(1): 30-37.

Greger, R. and W. Hampel (1981). "A modified system for in vitro perfusion of isolated renal tubules." *Pflugers Arch* **389**(2): 175-176.

Gross, P., W. W. Minuth, W. Kriz and E. Fromter (1986). "Electrical properties of renal collecting duct principal cell epithelium in tissue culture." *Pflugers Arch* **406**(4): 380-386.

Gunzel, D. and M. Fromm (2012). "Claudins and other tight junction proteins." Compr Physiol **2**(3): 1819-1852.

Gunzel, D. and A. S. Yu (2009). "Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle." Pflugers Arch **458**(1): 77-88.

Gunzel, D. and A. S. Yu (2013). "Claudins and the modulation of tight junction permeability." Physiol Rev **93**(2): 525-569.

Guo, L. J., A. A. Alli, D. C. Eaton and H. F. Bao (2013). "ENaC is regulated by natriuretic peptide receptor-dependent cGMP signaling." Am J Physiol Renal Physiol **304**(7): F930-937.

Guyton, A. C., T. G. Coleman, A. V. Cowley, Jr., K. W. Scheel, R. D. Manning, Jr. and R. A. Norman, Jr. (1972). "Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension." Am J Med **52**(5): 584-594.

Hadchouel, J., C. Busst, G. Procino, G. Valenti, R. Chambrey and D. Eladari (2011). "Regulation of extracellular fluid volume and blood pressure by pendrin." Cell Physiol Biochem **28**(3): 505-512.

Hagen, S. J. (2017). "Non-canonical functions of claudin proteins: Beyond the regulation of cell-cell adhesions." Tissue Barriers **5**(2): e1327839.

He, J. and B. Yang (2019). "Aquaporins in Renal Diseases." Int J Mol Sci **20**(2).

Himmerkus, N., S. L. Svendsen, C. Quintanova, M. Bleich, O. Von Schwerdtner, T. Benzing, P. A. Welling, J. Leipziger and M. M. Rinschen (2020). "Viewing Cortical Collecting Duct Function Through Phenotype-guided Single-Tubule Proteomics." Function **1**(1).

Hou, J. (2016). "Paracellular transport in the collecting duct." Curr Opin Nephrol Hypertens **25**(5): 424-428.

Hou, J., A. S. Gomes, D. L. Paul and D. A. Goodenough (2006). "Study of claudin function by RNA interference." J Biol Chem **281**(47): 36117-36123.

Hou, J., M. Rajagopal and A. S. Yu (2013). "Claudins and the kidney." Annu Rev Physiol **75**: 479-501.

Hou, J., A. Renigunta, J. Yang and S. Waldegg (2010). "Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(42): 18010-18015.

Husted, R. F., M. Hayashi and J. B. Stokes (1988). "Characteristics of papillary collecting duct cells in primary culture." Am J Physiol **255**(6 Pt 2): F1160-1169.

Kahle, K. T., I. Gimenez, H. Hassan, F. H. Wilson, R. D. Wong, B. Forbush, P. S. Aronson and R. P. Lifton (2004). "WNK4 regulates apical and basolateral Cl⁻ flux in extrarenal epithelia." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2064-2069.

Kahle, K. T., G. G. Macgregor, F. H. Wilson, A. N. Van Hoek, D. Brown, T. Ardito, M. Kashgarian, G. Giebisch, S. C. Hebert, E. L. Boulpaep and R. P. Lifton (2004). "Paracellular Cl⁻ permeability is regulated by WNK4 kinase: insight into normal physiology and hypertension." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(41): 14877-14882.

Kahle, K. T., F. H. Wilson, Q. Leng, M. D. Lalioti, A. D. O'Connell, K. Dong, A. K. Rapson, G. G. MacGregor, G. Giebisch, S. C. Hebert and R. P. Lifton (2003). "WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion." Nat Genet **35**(4): 372-376.

Kim, Y. H., V. Pech, K. B. Spencer, W. H. Beierwaltes, L. A. Everett, E. D. Green, W. Shin, J. W. Verlander, R. L. Sutliff and S. M. Wall (2007). "Reduced ENaC protein abundance contributes to the lower blood pressure observed in pendrin-null mice." Am J Physiol Renal Physiol **293**(4): F1314-1324.

Kim, Y. H., J. W. Verlander, S. W. Matthews, I. Kurtz, W. Shin, I. D. Weiner, L. A. Everett, E. D. Green, S. Nielsen and S. M. Wall (2005). "Intercalated cell H⁺/OH⁻ transporter expression is reduced in Slc26a4 null mice." Am J Physiol Renal Physiol **289**(6): F1262-1272.

Kiuchi-Saishin, Y., S. Gotoh, M. Furuse, A. Takasuga, Y. Tano and S. Tsukita (2002). "Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments." J Am Soc Nephrol **13**(4): 875-886.

Klinke, R. P., H-C; Kurtz, A; Silbernagl, S (2005). Physiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG.

Knepper, M. A. (1997). "Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin." Am J Physiol **272**(1 Pt 2): F3-12.

Knepper, M. A. and T. Inoue (1997). "Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin." Curr Opin Cell Biol **9**(4): 560-564.

Kojima, T., H. Yamaguchi, T. Ito, D. Kyuno, T. Kono, T. Konno and N. Sawada (2013). "Tight junctions in human pancreatic duct epithelial cells." Tissue Barriers **1**(4): e24894.

Kopp, P. (2014). "Mutations in the Pendred Syndrome (PDS/SLC26A) gene: an increasingly complex phenotypic spectrum from goiter to thyroid hypoplasia." J Clin Endocrinol Metab **99**(1): 67-69.

Kopp, P. and A. Bizehova (2011). "Clinical and molecular characteristics of Pendred syndrome." Ann Endocrinol (Paris) **72**(2): 88-94.

Kurtz, T. W., H. A. Al-Bander and R. C. Morris, Jr. (1987). ""Salt-sensitive" essential hypertension in men. Is the sodium ion alone important?" N Engl J Med **317**(17): 1043-1048.

Kurtz, T. W. and R. C. Morris, Jr. (1984). "Dietary chloride and bicarbonate as determinants of desoxycorticosterone hypertension." J Hypertens Suppl **2**(3): S371-373.

Kwong, R. W. and S. F. Perry (2013). "The tight junction protein claudin-b regulates epithelial permeability and sodium handling in larval zebrafish, Danio rerio." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **304**(7): R504-513.

Lashhab, R., A. C. Rumley, D. Arutyunov, M. Rizvi, C. You, H. Dimke, N. Touret, R. Zimmermann, M. Jung, X. Z. Chen, T. Alexander and E. Cordat (2019). "The kidney anion exchanger 1 affects tight junction properties via claudin-4." Sci Rep **9**(1): 3099.

Layton, A. T., V. Vallon and A. Edwards (2016). "A computational model for simulating solute transport and oxygen consumption along the nephrons." Am J Physiol Renal Physiol **311**(6): F1378-F1390.

Le Moellic, C., S. Boulkroun, D. Gonzalez-Nunez, I. Dublineau, F. Cluzeaud, M. Fay, M. Blot-Chabaud and N. Farman (2005). "Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells." Am J Physiol Cell Physiol **289**(6): C1513-1521.

Letz, B., A. Ackermann, C. M. Canessa, B. C. Rossier and C. Korbmacher (1995). "Amiloride-sensitive sodium channels in confluent M-1 mouse cortical collecting duct cells." *J Membr Biol* **148**(2): 127-141.

Leviel, F., C. A. Hübner, P. Houillier, L. Morla, S. El Moghrabi, G. Brideau, H. Hassan, H. Hatim, M. D. Parker, I. Kurth, A. Kougioumtzes, A. Sinning, V. Pech, K. A. Riemony, R. L. Miller, E. Hummler, G. E. Shull, P. S. Aronson, A. Doucet, S. M. Wall, R. Chambrey and D. Eladari (2010). "The Na⁺-dependent chloride-bicarbonate exchanger SLC4A8 mediates an electroneutral Na⁺ reabsorption process in the renal cortical collecting ducts of mice." *J Clin Invest* **120**(5): 1627-1635.

Li, W. Y., C. L. Huey and A. S. Yu (2004). "Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron." *Am J Physiol Renal Physiol* **286**(6): F1063-1071.

Li, Y., W. Wang, T. Jiang and B. Yang (2017). "Aquaporins in Urinary System." *Adv Exp Med Biol* **969**: 131-148.

Liebelt, A. G. (1998). Unique Features of Anatomy, Histology, and Ultrastructure Kidney, Mouse. *Urinary System. Monographs on Pathology of Laboratory Animals*. H. G. C. Jones T.C., Mohr U. Berlin, Heidelberg, Springer.

Loffing, J. and C. Korbmacher (2009). "Regulated sodium transport in the renal connecting tubule (CNT) via the epithelial sodium channel (ENaC)." *Pflugers Arch* **458**(1): 111-135.

Lorenz, J. N., H. Weihprecht, J. Schnermann, O. Skott and J. P. Briggs (1990). "Characterization of the macula densa stimulus for renin secretion." *Am J Physiol* **259**(1 Pt 2): F186-193.

Lu, J., X. Zhao, A. Paiardini, Y. Lang, I. Bottillo and L. Shao (2018). "Familial hypomagnesaemia, Hypercalciuria and Nephrocalcinosis associated with a novel mutation of the highly conserved leucine residue 116 of Claudin 16 in a Chinese patient with a delayed diagnosis: a case report." *BMC Nephrol* **19**(1): 181.

Lüllmann-Rauch, A. (2019). *Taschenlehrbuch Histologie* Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG

Lytle, C. and B. Forbush, 3rd (1996). "Regulatory phosphorylation of the secretory Na-K-Cl cotransporter: modulation by cytoplasmic Cl⁻." *Am J Physiol* **270**(2 Pt 1): C437-448.

Matter, K. and M. S. Balda (2003). "Signalling to and from tight junctions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(3): 225-236.

McKenna, T. J., D. P. Island, W. E. Nicholson and G. W. Liddle (1978). "Angiotensin stimulates both early and late steps in aldosterone biosynthesis in isolated bovine glomerulosa cells." *J Steroid Biochem* **9**(10): 967-972.

Milatz, S. (2019). "A Novel Claudinopathy Based on Claudin-10 Mutations." *Int J Mol Sci* **20**(21).

Milatz, S., S. M. Krug, R. Rosenthal, D. Gunzel, D. Muller, J. D. Schulzke, S. Amasheh and M. Fromm (2010). "Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes." *Biochim Biophys Acta* **1798**(11): 2048-2057.

Mineta, K., Y. Yamamoto, Y. Yamazaki, H. Tanaka, Y. Tada, K. Saito, A. Tamura, M. Igarashi, T. Endo, K. Takeuchi and S. Tsukita (2011). "Predicted expansion of the claudin multigene family." *FEBS Lett* **585**(4): 606-612.

Mitic, L. L., V. M. Unger and J. M. Anderson (2003). "Expression, solubilization, and biochemical characterization of the tight junction transmembrane protein claudin-4." *Protein Sci* **12**(2): 218-227.

Mohebbi, N., A. Perna, J. van der Wijst, H. M. Becker, G. Capasso and C. A. Wagner (2013). "Regulation of two renal chloride transporters, AE1 and pendrin, by electrolytes and aldosterone." *PLoS One* **8**(1): e55286.

Morla, L., A. Doucet, C. Lamouroux, G. Crambert and A. Edwards (2016). "The renal cortical collecting duct: a secreting epithelium?" *J Physiol* **594**(20): 5991-6008.

Muto, S., S. Ebata and Y. Asano (1994). "Short-term effects of uninephrectomy on electrical properties of the cortical collecting duct from rabbit remnant kidneys." *J Clin Invest* **93**(1): 286-296.

Nair, A. V., W. Yanhong, T. G. Paunescu, R. Bouley and D. Brown (2019). "Sex-dependent differences in water homeostasis in wild-type and V-ATPase B1-subunit deficient mice." *PLoS One* **14**(8): e0219940.

Ng, B. and P. H. Barry (1995). "The measurement of ionic conductivities and mobilities of certain less common organic ions needed for junction potential corrections in electrophysiology." *J Neurosci Methods* **56**(1): 37-41.

Nielsen, S., C. L. Chou, D. Marples, E. I. Christensen, B. K. Kishore and M. A. Knepper (1995). "Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(4): 1013-1017.

Nielsen, S., J. Frokiaer, D. Marples, T. H. Kwon, P. Agre and M. A. Knepper (2002). "Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine." *Physiol Rev* **82**(1): 205-244.

O'Neil RG, B. E. (1982). "Ionic conductive properties and electrophysiology of the rabbit cortical collecting tubule." *Am J Phys* **241:F81-F95**.

O'Neil RG, S. S. (1984). "Electrophysiological properties of tcellular and paracellular conductive pathways of the rabbitt cortical collecting duct." *J Membr Biol* **82:281-295**.

Ohta, A., S. S. Yang, T. Rai, M. Chiga, S. Sasaki and S. Uchida (2006). "Overexpression of human WNK1 increases paracellular chloride permeability and phosphorylation of claudin-4 in MDCKII cells." *Biochem Biophys Res Commun* **349**(2): 804-808.

Osanai, M., A. Takasawa, M. Murata and N. Sawada (2017). "Claudins in cancer: bench to bedside." *Pflugers Arch* **469**(1): 55-67.

Palmer, L. G. and G. Frindt (2007). "High-conductance K channels in intercalated cells of the rat distal nephron." *Am J Physiol Renal Physiol* **292**(3): F966-973.

Palmer, L. G. and J. Schnermann (2015). "Integrated control of Na transport along the nephron." *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **10**(4): 676-687.

Pearce, D., R. Soundararajan, C. Trimpert, O. B. Kashlan, P. M. Deen and D. E. Kohan (2015). "Collecting duct principal cell transport processes and their regulation." *Clin J Am Soc Nephrol* **10**(1): 135-146.

Pech, V., W. Zheng, T. D. Pham, J. W. Verlander and S. M. Wall (2008). "Angiotensin II activates H+-ATPase in type A intercalated cells." *J Am Soc Nephrol* **19**(1): 84-91.

Piala, A. T., T. M. Moon, R. Akella, H. He, M. H. Cobb and E. J. Goldsmith (2014). "Chloride sensing by WNK1 involves inhibition of autophosphorylation." *Sci Signal* **7**(324): ra41.

Plain Reyes, A. (2015). "Regulation of the tight junction permeabilities in the TAL."

Ponce-Coria, J., P. San-Cristobal, K. T. Kahle, N. Vazquez, D. Pacheco-Alvarez, P. de Los Heros, P. Juarez, E. Munoz, G. Michel, N. A. Bobadilla, I. Gimenez, R. P. Lifton, S. C. Hebert and G. Gamba (2008). "Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(24): 8458-8463.

Roy, A., M. M. Al-bataineh and N. M. Pastor-Soler (2015). "Collecting duct intercalated cell function and regulation." Clin J Am Soc Nephrol **10**(2): 305-324.

Royaux, I. E., S. M. Wall, L. P. Karniski, L. A. Everett, K. Suzuki, M. A. Knepper and E. D. Green (2001). "Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4221-4226.

Runggaldier, D., L. G. Pradas, P. H. Neckel, A. F. Mack, B. Hirt and C. Gleiser (2017). "Claudin expression in the rat endolymphatic duct and sac - first insights into regulation of the paracellular barrier by vasopressin." Sci Rep **7**: 45482.

Sansom, S. C. and R. G. O'Neil (1985). "Mineralocorticoid regulation of apical cell membrane Na⁺ and K⁺ transport of the cortical collecting duct." Am J Physiol **248**(6 Pt 2): F858-868.

Sansom, S. C., E. J. Weinman and R. G. O'Neil (1984). "Microelectrode assessment of chloride-conductive properties of cortical collecting duct." Am J Physiol **247**(2 Pt 2): F291-302.

Sawada, N., M. Murata, K. Kikuchi, M. Osanai, H. Tobioka, T. Kojima and H. Chiba (2003). "Tight junctions and human diseases." Med Electron Microsc **36**(3): 147-156.

Schmidt, R. F. L., F; Heckmann, M (2010). Physiologie des Menschen. Heidelberg.

Schultz, S. G. (1972). "Electrical potential differences and electromotive forces in epithelial tissues." J Gen Physiol **59**(6): 794-798.

Schuster, V. L. and J. B. Stokes (1987). "Chloride transport by the cortical and outer medullary collecting duct." Am J Physiol **253**(2 Pt 2): F203-212.

Schwartz, G. J., B. J. Zavilowitz, A. D. Radice, A. Garcia-Perez and J. M. Sands (1992). "Maturation of aldose reductase expression in the neonatal rat inner medulla." J Clin Invest **90**(4): 1275-1283.

Steensgaard, M., P. Svennningsen, A. R. Tinning, T. D. Nielsen, F. Jorgensen, G. Kjaersgaard, K. Madsen and B. L. Jensen (2010). "Apical serine protease activity is necessary for assembly of a high-resistance renal collecting duct epithelium." Acta Physiol (Oxf) **200**(4): 347-359.

Stoner, L. C., M. B. Burg and J. Orloff (1974). "Ion transport in cortical collecting tubule; effect of amiloride." Am J Physiol **227**(2): 453-459.

Stoos, B. A., A. Naray-Fejes-Toth, O. A. Carretero, S. Ito and G. Fejes-Toth (1991). "Characterization of a mouse cortical collecting duct cell line." Kidney Int **39**(6): 1168-1175.

Tatum, R., Y. Zhang, Q. Lu, K. Kim, B. G. Jeanssone and Y. H. Chen (2007). "WNK4 phosphorylates ser(206) of claudin-7 and promotes paracellular Cl(-) permeability." FEBS Lett **581**(20): 3887-3891.

Tatum, R., Y. Zhang, K. Salleng, Z. Lu, J. J. Lin, Q. Lu, B. G. Jeanssone, L. Ding and Y. H. Chen (2010). "Renal salt wasting and chronic dehydration in claudin-7-deficient mice." Am J Physiol Renal Physiol **298**(1): F24-34.

Terker, A. S., C. Zhang, K. J. Ersperer, G. Gamba, C. L. Yang and D. H. Ellison (2016). "Unique chloride-sensing properties of WNK4 permit the distal nephron to modulate potassium homeostasis." Kidney Int **89**(1): 127-134.

Terker, A. S., C. Zhang, J. A. McCormick, R. A. Lazelle, C. Zhang, N. P. Meermeier, D. A. Siler, H. J. Park, Y. Fu, D. M. Cohen, A. M. Weinstein, W. H. Wang, C. L. Yang and D. H. Ellison (2015). "Potassium modulates electrolyte balance and blood pressure through effects on distal cell voltage and chloride." Cell Metab **21**(1): 39-50.

Thomas, J., P. Deetjen, W. H. Ko, C. Jacobi and J. Leipziger (2001). "P2Y(2) receptor-mediated inhibition of amiloride-sensitive short circuit current in M-1 mouse cortical collecting duct cells." J Membr Biol **183**(2): 115-124.

Tobian, L., A. Tomboulian and J. Janecek (1959). "The effect of high perfusion pressures on the granulation of juxtaglomerular cells in an isolated kidney." J Clin Invest **38**(4): 605-610.

Van Itallie, C., C. Rahner and J. M. Anderson (2001). "Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability." J Clin Invest **107**(10): 1319-1327.

Van Itallie, C. M., L. L. Mitic and J. M. Anderson (2011). "Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex." J Biol Chem **286**(5): 3442-3450.

Verbalis, J. G. (2007). "How does the brain sense osmolality?" J Am Soc Nephrol **18**(12): 3056-3059.

Verlander, J. W., Y. H. Kim, W. Shin, T. D. Pham, K. A. Hassell, W. H. Beierwaltes, E. D. Green, L. Everett, S. W. Matthews and S. M. Wall (2006). "Dietary Cl(-) restriction upregulates pendrin expression within the apical plasma membrane of type B intercalated cells." Am J Physiol Renal Physiol **291**(4): F833-839.

Verrey, F., Hummler, E., Schild, L. & Rossier, B.C. (2000). Control of Na⁺ transport by aldosterone. The Kidney: Physiology and Pathophysiology. Philadelphia, Pennsylvania, Lippincott Williams and Wilkins. **3**: 1441-1471.

Vinciguerra, M., D. Mordasini, A. Vandewalle and E. Feraille (2005). "Hormonal and nonhormonal mechanisms of regulation of the NA,K-pump in collecting duct principal cells." Semin Nephrol **25**(5): 312-321.

Wagner, C. A., O. Devuyst, S. Bourgeois and N. Mohebbi (2009). "Regulated acid-base transport in the collecting duct." Pflugers Arch **458**(1): 137-156.

Wall, S. M., K. A. Hassell, I. E. Royaux, E. D. Green, J. Y. Chang, G. L. Shipley and J. W. Verlander (2003). "Localization of pendrin in mouse kidney." Am J Physiol Renal Physiol **284**(1): F229-241.

Wang, F., R. Luo, K. Peng, X. Liu, C. Xu, X. Lu, S. Soodvilai and T. Yang (2020). "Soluble (pro)renin receptor regulation of ENaC involved in aldosterone signaling in cultured collecting duct cells." Am J Physiol Renal Physiol **318**(3): F817-F825.

Warden, D. H., V. L. Schuster and J. B. Stokes (1988). "Characteristics of the paracellular pathway of rabbit cortical collecting duct." Am J Physiol **255**(4 Pt 2): F720-727.

Wemeau, J. L. and P. Kopp (2017). "Pendred syndrome." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **31**(2): 213-224.

Whitescarver, S. A., C. E. Ott, B. A. Jackson, G. P. Guthrie, Jr. and T. A. Kotchen (1984). "Salt-sensitive hypertension: contribution of chloride." Science **223**(4643): 1430-1432.

Wilson, F. H., S. Disse-Nicodeme, K. A. Choate, K. Ishikawa, C. Nelson-Williams, I. Desitter, M. Gunel, D. V. Milford, G. W. Lipkin, J. M. Achard, M. P. Feely, B. Dussol, Y. Berland, R. J. Unwin, H. Mayan, D. B. Simon, Z. Farfel, X. Jeunemaitre and R. P. Lifton (2001). "Human hypertension caused by mutations in WNK kinases." Science **293**(5532): 1107-1112.

Wilson, F. H., K. T. Kahle, E. Sabath, M. D. Lalioti, A. K. Rapson, R. S. Hoover, S. C. Hebert, G. Gamba and R. P. Lifton (2003). "Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(2): 680-684.

Wittner, M., E. Desfleurs, S. Pajaud, G. Moine, S. Simeone, C. de Rouffignac and A. Di Stefano (1997). "Calcium and magnesium transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop: influence of age and gender." Pflugers Arch **434**(4): 451-456.

Yamaguti, P. M., F. A. Neves, D. Hotton, C. Bardet, M. de La Dure-Molla, L. C. Castro, M. D. Scher, M. E. Barbosa, C. Ditsch, J. C. Fricain, R. de La Faille, M. L. Figueres, R. Vargas-Poussou, P. Houillier, C. Chaussain, S. Babajko, A. Berdal and A. C. Acevedo (2017). "Amelogenesis imperfecta in familial hypomagnesaemia and hypercalciuria with nephrocalcinosis caused by CLDN19 gene mutations." J Med Genet **54**(1): 26-37.

Yamauchi, K., T. Rai, K. Kobayashi, E. Sohara, T. Suzuki, T. Itoh, S. Suda, A. Hayama, S. Sasaki and S. Uchida (2004). "Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4690-4694.

Yang, C. L., J. Angell, R. Mitchell and D. H. Ellison (2003). "WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport." J Clin Invest **111**(7): 1039-1045.

Ziemens, A., S. R. Sonntag, V. C. Wulfmeyer, B. Edemir, M. Bleich and N. Himmerkus (2019). "Claudin 19 Is Regulated by Extracellular Osmolality in Rat Kidney Inner Medullary Collecting Duct Cells." Int J Mol Sci **20**(18).

Zucker, I. and A. K. Beery (2010). "Males still dominate animal studies." Nature **465**(7299): 690.

7 Anhang

7.1 Versuchtiere

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

8 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinen Doktoreltern Prof. Dr. med. Markus Bleich und Dr. med. Nina Himmerkus für die stete und unermüdliche Unterstützung, die vielen nützlichen Ratschläge und die umfassende, verlässliche und herzliche Betreuung.

Darüber hinaus gilt mein Dank Lieske Jarck für die produktive Zusammenarbeit, sowie Cosima Merkel für die fachliche und persönliche Hilfestellung während der Zeit im Labor. Ebenfalls danken möchte ich allen weiteren wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen MitarbeiterInnen der AG Bleich sowie des Physiologischen Instituts für die engagierte Hilfe, welche die Umsetzung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Jianghui Hou, der Washington University, St. Louis, USA danke ich für die freundliche Zurverfügungstellung der verwendeten Mauslinie.

Zudem danke ich allen Mitarbeitern des Victor-Hensen-Tierhaus für die reibungslose und verlässliche Zusammenarbeit.

Der Medizinischen Fakultät der CAU Kiel danke ich für die generöse Unterstützung der Arbeit durch ein Stipendium zur Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern für die emotionale und finanzielle Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit. Meiner Freundin und meinen FreundInnen danke ich für die wohlwollende Unterstützung, das Verständnis und die fortwährende Motivation während des Schreibens dieser Arbeit.

Veröffentlichungen

Giesecke, T., N. Himmerkus, J. Leipziger, M. Bleich, T. A. Koshimizu, M. Fahling, A. Smorodchenko, J. Shpak, C. Knappe, J. Isermann, N. Ayasse, K. Kawahara, J. Schmoranzer, N. Gimber, A. Paliege, S. Bachmann, and K. Mutig. 2019. "Vasopressin Increases Urinary Acidification via V1a Receptors in Collecting Duct Intercalated Cells." *J Am Soc Nephrol* 30 (6): 946-961.

Veröffentlichungen in Vorbereitung

J. Isermann et al. "High variability in function and selectivity of the paracellular pathway of the cortical collecting duct of mice"

Poster

Isermann, J., Jarck, L., Himmerkus, N., Hou, J., Milatz, S., Bleich, M. (2017) Role of Claudin-4 in paracellular chloride transport in the collecting duct. 96. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Greifswald März 2017

Himmerkus, N., Isermann, J., Jarck, L., Gong, Y., Hou, J., Milatz, S., Bleich, M., (2017) Paracellular properties of the cortical collecting collecting duct, 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Mannheim September 2017

Vorträge

Isermann, J. Jarck, L., Himmerkus, N., Hou, J., Milatz, S., Bleich, M. (2017) Claudin-4 in der parazellulären Chlorid-Resorption im Sammelrohr der Niere, 22.Treffen der Ostseephysiologen, Rostock Juni 2017

Himmerkus, N., Isermann, J., Jarck, L., Gong, Y., Milatz, S., Hou, J., Bleich, M., (2017) Paracellular properties of the cortical collecting collecting duct, American Society of Nephrology –Kidney Week, New Orleans, LA, Oktober 2017