

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. F. Maier  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg  
AG Molekulare und Experimentelle Pharmakologie  
Leiter: Prof. Dr. R. M. Nüsing

**Untersuchungen zur Prostaglandin-abhängigen  
Pathogenese des antenatalen Bartter-Syndroms am  
Zellmodell primär kultivierter Nierenepithelzellen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Friederike Isabella Simon**

aus Heidelberg

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. R. M. Nüsing

1. Koreferent:

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>3</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
1.1 Nierenphysiologie.....	6
1.2 Bartter Syndrom .....	6
1.3 Charakterisierung des dicken aufsteigenden Teils der Henle`schen Schleife (m-TAL) und seiner Transportproteine .....	10
1.4 Antenatales Bartter Syndrom (aBS) .....	14
1.5 Therapie und Prognose der tubulären Salzverlusttubulopathien.....	15
1.6 Synthese und Funktion der Prostaglandine.....	17
1.7 Fragestellung.....	19
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>21</b>
2.1 Häufig verwendete Lösungen.....	21
2.2 Isolierung und Kultivierung von m-TAL Zellen aus Schweinenieren.....	21
2.3 Widerstandsmessung.....	23
2.4 Immunhistochemische Untersuchungen.....	23
2.4.1 APAAP .....	23
2.4.2 Immunfluoreszenz .....	25
2.5 Zusammensetzung der verwendeten Stimulationslösungen .....	25
2.6 Stimulation der m-TAL Zellen.....	27
2.7 PGE <sub>2</sub> -ELISA .....	27

---

2.8 Gel-Elektrophorese .....	29
2.9 Western Blot.....	30
2.10 RNA Isolierung und Quantifizierung aus kultivierten m-TAL-Zellen.....	31
2.11 DNase-Verdau .....	33
2.12 Reverse Transkription .....	33
2.13 PCR.....	34
2.14 Auftrennung des PCR-Produktes im Agarosegel .....	35
2.15 Statistik.....	37
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
3.1 Charakterisierung des m-TAL.....	38
3.1.1 Morphologie des m-TAL .....	38
3.1.2 Tamm-Horsfall-Protein-Expression .....	39
3.1.3 Widerstandsmessung des m-TAL .....	40
3.1.4 Expression des NKCC2-Cotransporters und des ROMK-Kanals .....	41
3.2. RT-PCR der PGES-1 und von COX-1 und COX-2 .....	42
3.3 Immunhistochemische Untersuchung .....	43
3.4 Effekte verschiedener Salzkonzentrationen auf die PGE <sub>2</sub> -Synthese.....	46
3.4.1 Stimulation mit der Lösung Standardlösung plus Furosemid.....	47
3.4.2 Stimulation mit hypotoner Lösung .....	47
3.4.3 Stimulation mit isotoner hypoosmolarer Lösung.....	48
3.4.4 Stimulation mit hypotoner Lösung plus MAP-Kinase-Hemmstoff 203580.....	SB 49
3.5 RNA-Expression.....	50
3.5.1 RNA-Expression der COX-1 und COX-2-Isoenzyme nach Stimulation mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen .....	50

---

3.5.2 RNA-Expression der mPGES-1 nach Stimulation mit unterschiedlichen Salzlösungen .....	54
3.6 Expression von COX 1 und COX 2 im Western Blot .....	58
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>59</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>64</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>66</b>
<b>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>75</b>
<b>8. TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>76</b>
<b>9. LEBENSLAUF</b>	<b>77</b>
<b>10. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER</b>	<b>79</b>
<b>11. DANKSAGUNG</b>	<b>80</b>
<b>12. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	<b>81</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Nierenphysiologie**

Die Konstanthaltung des Volumens und der Osmolalität des Extrazellulärtraumes ist eine Voraussetzung für die Funktion vieler unterschiedlicher Mechanismen unseres Körpers. Der Niere kommt beim Menschen die größte Bedeutung in der Konstanthaltung des Wasserhaushaltes zu. In den verschiedenen Abschnitten der Niere stehen unterschiedliche Mechanismen zur Elektrolytregulation zur Verfügung. Allgemein lässt sich sagen, dass die proximalen Tubuli leak sind und große Mengen des Wassers aus dem Lumen gegen einen kleinen Konzentrationsgradienten in die Zellen transportieren. Überdies sind die distalen Abschnitte mitteldicht und können kleine Mengen Wasser gegen einen großen Konzentrationsgradienten transportieren.

### **1.2 Bartter Syndrom**

Es existieren mehrere Krankheiten die mit Entgleisungen des Elektrolyt- und Wasserhaushalts einhergehen. Bei angeborenen Salzverlust-Tubulopathien, häufig unter dem Begriff Bartter-Syndrom (BS) zusammengefasst, handelt es sich um autosomal-rezessiv vererbte Krankheitsbilder, die zu einer metabolischen hypokaliämischen Alkalose führen. Mittlerweile ist bekannt, dass es sich dabei um eine Gruppe von genetisch bedingten Erkrankungen handelt, bei denen dem Körper aufgrund unterschiedlicher Defekte in der Niere Salz entzogen wird [Seyberth et al. 2001]. 1957 wurde von den amerikanischen Pädiatern Rosenbaum und Hughes zum ersten Mal der Fall eines 2 Monate alten Säuglings beschrieben, der unter ausgeprägter Gedeihstörung, Dehydratation, sporadisch auftretender Diarrhoe, therapieresistenter hypokalämischer Alkalose, renalem Konzentrationsdefizit und Hyperkaliurie litt und mit 7 ½ Monaten in extremer Dystrophie verstarb [Rosenbaum, Hughes, 1957]. Das so genannte Bartter Syndrom wurde dann 1962 erstmals von Bartter et al. beschrieben [Bartter et al. 1962]. Die Kinder fielen durch schwere Gedeihstörungen, Dehydratation, hypokaliämische Alkalose, Isostenurie und Hyperkalziurie auf. Zusätzlich zu diesen Symptomen wiesen die Patienten außerdem eine Hyperreninämie und einen Hyperaldosteronismus auf. Seitdem wurde bei Krankheitsbildern mit hypokalämischer

---

Alkalose und Hyperaldosteronismus kombiniert mit Normotension vom Bartter-Syndrom gesprochen. Als mögliche Ursache für die Hyperreninämie wurde 1976 in der Niere eine erhöhte Prostaglandinaktivität vermutet [Bartter et al. 1976].

Durch das Auftreten weiterer Fälle wurde das Krankheitsbild genauer differenziert. 1966 berichteten Gitelman et al. über 3 erwachsene Patienten mit intermittierender Tetanie, Hypokaliämie und Hypomagnesiämie, jedoch ohne Polyurie [Gitelman et al., 1966]. Patienten mit neonataler Manifestation und schwerer klinischer Symptomatik, als weitere Variante des klassischen Bartter-Syndroms, wurden ebenfalls beschrieben [Marlow et al. 1982, Ohlsson et al. 1984, Proesmans et al. 1985].

Durch molekulargenetische und pharmakologische Studien gelang es in den letzten Jahren nachzuweisen, dass es sich um mehrere pathophysiologisch eigenständige Erkrankungen des tubulären Ionentransports in der Niere handelt [Hebert 2003].

Als Ursache für die unterschiedlichen Krankheitsbilder wurden Mutationen in verschiedenen Transportproteinen nachgewiesen. Beim Bartter Syndrom (BS) Typ 1 liegen die Mutationen im Furosemid-sensitiven NaK<sub>2</sub>Cl-Kotransporter im NKCC2-Gen auf Chromosom 15q15-21 [Naesens et al. 2004], beim BS Typ 2 im apikalen K<sup>+</sup>-Kanal (ROMK) im KCNJ1-Gen auf Chromosom 11q24-25 [Simon et al. 1996] und beim BS Typ 3 im basolateralen Cl<sup>-</sup>-Kanal ClC-Kb im CLCNKB-Gen auf Chromosom 1p36, vor. Typ 4 ist durch einen Defekt in Barttin, der essentiellen  $\beta$ -Untereinheit des ClC-K-Kanals gekennzeichnet, die neben der basolateralen Membran der Henle'schen Schleife auch im Innenohr exprimiert wird. Der Phänotyp zeigt klinisch eine zusätzliche Taubheit, da die Produktion der K<sup>+</sup>-reichen Endolymphe gehemmt ist (antenatales Bartter Syndrom mit sensorischer Taubheit). Ein weiteres Symptom ist ein chronisches Nierenversagen, das beim aBS (antenatales Bartter Syndrom) normalerweise nicht auftritt [Jeck et al., 2001]. Bei Typ 5 liegt eine aktivierende Mutation im Gen CASR vor, das für den extrazellulären Calcium-Ion-Sensing-Rezeptor CaSR kodiert, wodurch die Funktion von NKCC2 und ROMK inhibiert wird. In Tabelle 1 sind die einzelnen Typen und die ursächlichen Mutationen gegenüber gestellt.

Erkrankung	Locus Symbol	Gen	Genprodukt	Funktion/ Lokalisation (Lok.)
<b>BS Typ 1,</b> FSLT, antenatales BS	15q15-21	SLC12A1	NKCC2	Na <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup> -Wiederaufnahme Lok.: TAL
<b>BS Typ 2</b> FSLT, antenatales BS	11q24-25	KCNJ1	ROMK	K <sup>+</sup> -Versorgung NKCC2 Lok.: TAL
<b>BS Typ 3</b> Furosemid- Thiazid SLT, klassisches BS	1p36	CLCNKB	CIC-Kb	Cl <sup>-</sup> -Wiederaufnahme Lok.: TAL, distaler Tubulus, CCD
<b>BS Typ 4</b> FSLT, antenatales BS	1p31	BSND	Barttin	β-UE (CIC-Ka) Lok.: TAL β-UE (CIC-Kb) Lok.: TAL β-UE (Clc-Ka/Kb) Lok.: vask. Stria
<b>BS Typ 5</b> FSLT	3q13.3-q21	CASR	CaSR	Hemmung NKCC2, ROMK und Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPase, Lok.: TAL

**Tabelle 1** Genetische Charakterisierung des Bartter Syndroms, FSLT: Furosemide-like salt-losing tubulopathy, BS: Bartter Syndrom, tAL: dünner aufsteigender Ast der Henle'schen Schleife, TAL: dicker aufsteigender Ast der Henle'schen Schleife, NKCC2: Furosemid-sensitiver Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>2Cl<sup>-</sup>-Kotransporter, ROMK: Luminaler ATP-regulierter K<sup>+</sup>-Kanal, CIC-Kb: Basolateraler Cl<sup>-</sup>-Kanal, NCCT: Thiazid-sensitiver Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-Kotransporter, CCD: Kortikales Sammelrohr, CaSR: Ca<sup>2+</sup>-sensitiver Rezeptor

Klinisch ist die Unterteilung in 4 Typen sinnvoll: antenatales Bartter Syndrom, klassisches Bartter Syndrom, antenatales Bartter Syndrom mit sensorischer Taubheit und Gitelman-Syndrom. Sie unterscheiden sich zum einen hinsichtlich ihres Manifestationsalters zum anderen in der Schwere des klinischen Bildes. In Tabelle 2 sind die einzelnen Erkrankungen, Manifestationsalter, Klinik und Auswirkungen auf den Salz-Wasserhaushalt schematisch dargestellt.



	<b>Antenatales BS BS Typ 1,2</b>	<b>„Klassisches“ BS BS Typ 3</b>	<b>Antenatales BS mit Innenohr- schwerhörigkeit BS Typ 4</b>	<b>Gitelman- Syndrom</b>
Mani- festations- alter	neonatal	frühe Kindheit	neonatal	Kindheit oder Adoleszenz
Schwanger- schaft	Polyhydramnion/ Frühgeburlichkeit	oft Polyhydramnion/ Frühgeburlichkeit	Polyhydramnion/ Frühgeburlichkeit	-
Klinik/ Verlauf unbehandelt	Wachstums- retardierung, Exsikkose, Nephrokalzinose  letaler Verlauf	Wachstums- retardierung, Exsikkose, Nephrokalzinose,  milder Verlauf	Wachstums- retardierung, Exsikkose, Nephrokalzinose, Innenohr- schwerhörigkeit, chronisches Nierenversagen  letaler Verlauf	intermittierende Muskelschwäch eTetanie  milder Verlauf
Salz-/ Wasser- haushalt	metabolische Alkalose, Hypokaliämie, vermehrte NaCl- und Ca- Ausscheidung, hyper- reninämischer Hyper- aldosteronismus	metabolische Alkalose Hypokaliämie, vermehrte NaCl- und Ca- Ausscheidung, hyperreninämischer Hyperaldosteronis- mus	metabolische Alkalose, Hypokaliämie, vermehrte NaCl- und Ca-Ausscheidung, hyperreninämischer Hyperaldosteronismus	metabolische Alkalose, Hypokaliämie, Hypo- magnesiämie, renale NaCl- Ausscheidung normal bis erhöht, verminderte Ca- Ausscheidung, hyper- reninämischer Hyper- aldosteronismus
Molekulare Ursachen	Funktionsverlust NKCC2, ROMK oder CaSR	Funktionsverlust Chloridkanal (ClC- Kb)	Funktionsverlust Barttin (und dadurch von ClC-Ka und ClC- Kb)	Funktionsverlust Na <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup> Kotransporter (NCCT)

**Tabelle 2** Klinische Charakterisierung des Bartter Syndroms

---

### **1.3 Charakterisierung des dicken aufsteigenden Teils der Henle'schen Schleife (m-TAL) und seiner Transportproteine**

Der m-TAL (thick ascending limb) ist der Sitz der verantwortlichen Transportproteine, welche beim Bartter Syndrom in ihrer Funktion gestört sind. Beim m-TAL handelt es sich um den dicken, aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife. Dieser Abschnitt der Niere ist praktisch wasserimpermeabel. Mit Hilfe des NaK<sub>2</sub>Cl-Kotransporters werden dennoch ca. 25%-30% der filtrierten Natrium- und Chloridmenge resorbiert. Der m-TAL beginnt in der Außenzone des Nierenmarks am Übergang der Innenzone in den Innenstreifen, steigt weiter in den Außenstreifen und dann in die Rinde auf und bildet an der Kontaktstelle mit dem zugehörigen Nierenkörperchen die Macula densa aus. Kurz hinter der Macula densa geht der m-TAL in die pars convoluta über. Der m-TAL besteht aus interdigitierenden Epithelzellen, deren basolaterale Fortsätze reich an Mitochondrien zur Energiebereitstellung für die basolaterale Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase sind. Die dichte Verbindung der Zellen untereinander wird durch eine stark entwickelte Zonula occludens gewährleistet. Die luminaire Oberfläche der TAL-Zellen ist spärlich mit Mikrovilli ausgestattet. Die im TAL integrierte Macula densa ist ein Plateau aus ca. 20-30 Zellen, die dem extraglomerulären Mesangium angelagert sind und einen Teil des juxtaglomerulären Apparates darstellen. Die Zellen der Macula densa besitzen große Zellkerne, die im lichtmikroskopischen Bild dicht nebeneinander erscheinen. Die Zellen sind nicht miteinander interdigitiert und besitzen deutliche Interzellularspalten. Sie unterscheiden sich daher im Erscheinungsbild deutlich von den m-TAL-Zellen. Die charakteristischen Transportproteine und -kanäle des TAL sind der NaK<sub>2</sub>Cl-Kotransporter, NKCC2, der Kaliumkanal ROMK (renal outer-medullary K<sup>+</sup>), der Chloridkanal ClC-Kb, Barttin, und der Calcium-sensing receptor CaSR.

#### NKCC2:

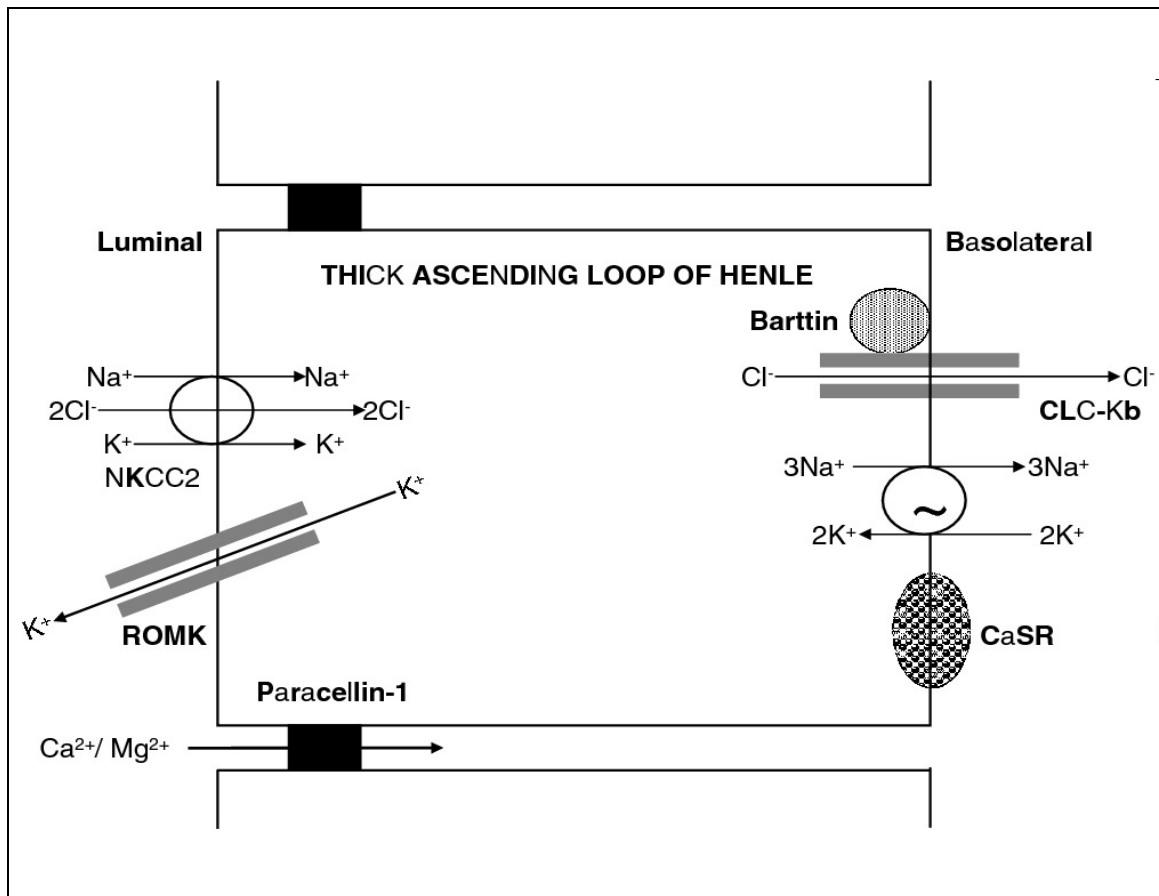
Der luminaire NaK<sub>2</sub>Cl-Transporter (NKCC2) gehört zur Familie der Kationengekoppelten Chloridtransporter. Es handelt sich hierbei um ein großes Protein aus 1100 Aminosäuren mit 12 membranständigen Helices und einem Molekulargewicht von 120 kDa [Obermüller et al. 1996, Haas et. al. 2000].

Bei den NKCC2-Kotransportern lassen sich zwei Isoformen unterscheiden: NKCC1, ein weit verbreiteter Carrier, der auf der basolateralen Seite von polarisierten Zell-Typen

exprimiert wird [Haas, Forbush III, 2000; Lytle et al. 1995] und bei Sekretionsvorgängen beteiligt ist, und der nierenspezifische Carrier NKCC2, der an der luminalen Membran des dicken aufsteigenden Astes der Henle Schleife sowie in der Macula Densa vorkommt [Mount et al. 1999; Obermuller et al. 1996]. Das entsprechende Gen ist das SLC12A1 auf Chromosom 15q15-21 [Naesens et al. 2004].

Das Transportprotein NKCC2 schleust jeweils 1 Natrium-, 1 Kalium- und 2 Chloridionen vom Lumen in die Zelle. Hierbei ist die treibende Kraft für den Natriumeinstrom ein osmotischer Gradient nach intrazellulär, den die basolateral lokalisierte Na-K-ATPase erzeugt.

Die Resorption von Natrium dient nicht nur der Konservierung von Natrium, sondern ist auch unerlässlich für den Aufbau eines hohen osmotischen Gradienten im Niereninterstitium, dieser ermöglicht das physiologische Konzentrationsvermögen der Niere (Gegenstromprinzip). Schleifendiuretika, wie Furosemid, blockieren den NKCC2 Carrier und verhindern somit eine effektive Konzentrierung des Harns. PGE<sub>2</sub> kann über den EP3-Rezeptor und ein inhibitorisches G-Protein die Adenylatcyclase hemmen, was zu einer erniedrigten Konzentration von cAMP führt und somit die NKCC2 Expression hemmt [Shankar, Brater 2003]. Über den NaK2Cl-Kotransporter wird Natrium apikal in die Zelle aufgenommen und basolateral von der Na-K-ATPase wieder ausgeschleust. Um die Funktion des Transporters zu gewährleisten ist eine ausreichend hohe Kaliumkonzentration die Voraussetzung. Für die Konstanthaltung der Kaliumkonzentration dienen apikal gelegene Kaliumkanäle (ROMK), welche Kalium wieder ins Lumen ausscheiden.



**Abbildung 1** Schematische Darstellung der Transportmechanismen im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife. NaK<sub>2</sub>Cl-Kotransporter, ROMK, CLC-Kb und CaSR. Quelle: SpringerImages

Der NaK<sub>2</sub>Cl-Kotransporter lässt sich durch den Wirkstoff Furosemid hemmen (Handelsname z.B. Lasix®). Furosemid gelangt durch aktive Sekretion im proximalen Tubulus der Henle'schen Schleife ins Lumen, von hier wirkt Furosemid an dem Transporter. Durch die im Vergleich zum Plasma hohe luminal Furosemid-Konzentration wird eine fast selektive renale Wirkung erzielt. Durch die Hemmung des NaK<sub>2</sub>Cl-Transporters kommt es u. a. zu einer Natriurese und Kaliurese. Die Kaliurese entsteht durch eine erhöhte Aldosteron-Freisetzung. Die Natriurese macht man sich in der Klinik zu Nutze um Wasseransammlungen im Körper (Ödeme, Aszites) zu behandeln. Mögliche Nebenwirkungen einer Therapie mit Lasix® sind z. B. eine Hypovolämie, Hypokaliämie, Hyponatriämie, sekundäres Nieren-versagen aber auch Hörschaden sind durch Hemmung der Endolymphproduktion möglich, besonders wenn andere ototoxische Medikamente verabreicht werden (z.B. Aminoglykoside). In Anlehnung an die Wirkweise von Furosemid und der daraus folgenden klinischen

---

Symptomatik wird das aBS auch als „Furosemid-ähnliche Salzverlusttubulopathie“ bezeichnet [Reinalter et al. 2004].

#### CLC-K:

In der Niere werden zwei Formen des CLC-K Chlorid Transporters exprimiert, ClC-K1 (bei der Maus; entspricht dem menschlichen Ka) und ClC-K2 (bei der Maus; entspricht dem menschlichen Kb). Hierbei handelt es sich um basolateral gelegene, cAMP regulierte Ionenkanäle. Durch deren Chloridresorption wird über dem Epithel eine elektrische Spannung aufgebaut. Diese Spannung wiederum ist der Antrieb für die parazelluläre Resorption von  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$  durch das kationenselektive Schlußleistennetz. ClC-K1 wird im dünnen aufsteigenden Ast der Henle-Schleife exprimiert, findet sich aber auch in anderen Regionen des distalen Nephrons z. B. der Rattenniere [Waldegger et al. 2002].

ClC-K2 befindet sich vor allem im distalen Nephron (dicker aufsteigender Ast der Henle-Schleife) an der basolateralen Membran [Yoshikawa et al. 1999] und spielt dort bei der Chlorid Resorption eine wichtige Rolle. ClC-K1 ist für die hohe Chlorid-Permeabilität im dünnen aufsteigenden Ast der Henle-Schleife verantwortlich und ist somit notwendig für die Urinkonzentrierung. ClC-K1<sup>-/-</sup> Mäuse weisen einen Defekt in der Fähigkeit den Urin zu konzentrieren [Uchida, 2000] auf.

#### ROMK:

Essentiell für das Aufrechterhalten der Funktion des NKCC2 ist eine ausreichend hohe luminale  $\text{K}^{+}$ -Konzentration. Hierfür spielt der Ionentransportkanal ROMK eine wichtige Rolle. ROMK ist ein ATP-regulierter-einwärtsgerichteter-Niedrigspannung Kaliumkanal, der in der apikalen Membran von distalen Tubulus- und Sammelrohrzellen lokalisiert ist [Frindt et al. 1989, Schlatter et al. 1992]. Es sind fünf Formen des ROMK-Proteins bekannt, welche durch Splicing des gleichen Gens entstehen [Shuck et al. 1995]. Im dicken, aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife dient er dem Recycling von Kalium ins Lumen und im distalen Konvolut sowie im Sammelrohr der Kaliumsekretion [Wang et al. 1990-a und 1990-b, Zhou et al. 1992]. Das entsprechende Gen ist KCNJ1 und liegt auf Chromosom 11q24-25 [Simon et al. 1996].

---

## 1.4 Antenatales Bartter Syndrom (aBS)

1985 beschrieben Seyberth et al. das Hyperprostaglandin-E-Syndrom als eine Unterart des Bartter-Syndroms [Seyberth et al. 1985]. Das Syndrom wird auch als antenatales BS (aBS), FSLT (Furosemide-like salt-losing tubulopathy) oder hyperkalziurisches Bartter-Syndrom bezeichnet [Köckerling et al, 1998]. Es handelt sich typischerweise um ein schweres Krankheitsbild, das sich bereits pränatal manifestiert. Die massive fetale isoosmolare bis hypoosmolare Polyurie führt gegen Ende des zweiten Schwangerschafts-Trimenons (24.-30 SSW) zur Ausbildung eines Polyhydramnions, welches für die Frühgeburtslichkeit verantwortlich gemacht wird [Jeck et. al. 2001]. Postpartal zeigt sich ein exzessiver renaler Kochsalzverlust mit Ausscheidung eines hypoosmolaren Urins. Daraus resultiert ein Gewichtsverlust von bis zu 25% und eine hypokaliämische, hypochlorämische, metabolische Alkalose [Fanconi et al, 1971]. Im weiteren Verlauf bildet sich jedoch regelmäßig eine Hyperkaliurie mit unterschiedlich stark ausgeprägter hypokaliämischer Alkalose aus [Fanconi et al, 1971]. Charakteristisch für das aBS ist gleichzeitig eine Hyperkalziurie, die zumeist schon innerhalb der ersten Lebenswochen zur Nephrokalzinose führt [Shoemaker et al. 1993].

Typisch für das aBS ist neben der Polyurie und dem Salzverlust eine massiv erhöhte renale Ausscheidung von  $\text{PGE}_2$ . Diese erhöhte  $\text{PGE}_2$ -Biosynthese ist außerdem mit einer normotensiven Hyperreninämie und einem sekundären Hyperaldosteronismus assoziiert. Ferner treten – vermutlich durch  $\text{PGE}_2$  vermittelt - systemische Symptome wie Fieber, Erbrechen, sekretorische Diarrhoe und Osteopenie auf, in der Folge wird oft auch eine Wachstumsretardierung beobachtet [Seyberth et al. 1987].

Beim aBS finden sich Mutationen der Kanalproteine die im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife lokalisiert sind. Bei Defekt einer dieser Transportkomponenten kommt es zum Erliegen der Kochsalzresorption und damit zum Bild des aBS [Seyberth HW, 2008].

Neben dem primären tubulären Transportdefekt spielt der erhöhte  $\text{PGE}_2$ -Spiegel eine zentrale Rolle beim aBS.  $\text{PGE}_2$  hemmt den Chloridkanal (ClC-Kb), was eines der Hauptsymptome der tubulären Salzverlustsyndrome bedingt, eine gestörte Chloridaufnahme. [Ling BN et al, 1994].  $\text{PGE}_2$  reduziert an der Henle'schen-Schleife über EP3-Rezeptoren die Funktion der Adenylatcyclase. Dadurch wird ATP vermindert

zu cAMP abgebaut, das normalerweise den Chlorid-Kanal (ClC-K), sowie den NaK2Cl-Transporter [Shanker, Brater 2003] stimuliert und damit die Reabsorption fördert. Fällt dieser Stimulus weg, können dem Chlorid kein Natrium, Magnesium und Calcium folgen bzw. kann NaCl nicht resorbiert werden und damit kommt es zu einer verminderten Konzentrierungsfähigkeit des Harns. In der Macula Densa wird die Salzionenkonzentration gemessen und durch den Salzverlust wird per Feedbackmechanismus das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert [Badzyska B. et al, 2008], welches einem Volumen-Verlust bzw. einem Hypotonus entgegenarbeitet. Man vermutet, dass dieser Mechanismus über COX-2 und PGE<sub>2</sub> reguliert wird [Jensen BL, Schmid C, and Kurtz A. 1996]. Beim Ausfall des NKCC2 bzw. des ROMK ist auch die Chloridkonzentration erniedrigt, dies führt zu einer erhöhten COX-2 Expression und somit auch zu einer vermehrten PGE<sub>2</sub> Synthese. Es wird vermutet, dass PGE<sub>2</sub> über spezifische EP4 Rezeptoren in den juxtaglomerulären Zellen das RAAS durch Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration aktiviert [Nüsing et al. 2005].

### **1.5 Therapie und Prognose der tubulären Salzverlusttubulopathien**

Da eine Heilung dieser Erkrankungen nicht möglich ist, kann es bei der Therapie bisher nur darum gehen, die Symptomatik so gut wie möglich zu beherrschen. Primär besteht sie in einer ausreichenden Flüssigkeitszufuhr und Elektrolytsubstitution mit NaCl und gegebenenfalls auch KCl [Peco-Antic A. et al, 2001]. Zusätzlich werden COX-Hemmer, in der Regel Indomethacin, zur Senkung der erhöhten Prostaglandinspiegel gegeben und zählen inzwischen zur Standardtherapie [Seyberth et al, 1998]. Die pathologisch erhöhte Diurese bei den Patienten kann durch Hemmung der PGE<sub>2</sub> -Synthese um ca. 50% erniedrigt [Seyberth et al. 1985, Nüsing et al. 2001, Reinalter et al. 2002] und die Reninaktivität in den Normbereich gesenkt werden.

Um weitere Therapiemöglichkeiten zu entwickeln wurden auch pränatale Therapieversuche mit COX-Hemmern durchgeführt. Nach molekulargenetischer Diagnose der Erkrankung an Amnionzellen wurde eine Therapie mit Indomethacin in der 26. bis 31. SSW durchgeführt, wodurch eine Reduzierung des Polyhydramnions und Verlängerung der Schwangerschaft erreicht werden konnte [Konrad et al, 1999].

Diese Therapie ist nicht ohne Risiko, da die Gefahr eines Verschlusses des Ductus arteriosus, v.a. bei einer langen (>48 h) Behandlung nach der 32. SSW besteht, zudem Indomethacin eine geringe therapeutische Breite aufweist. Es besteht die Gefahr eines Nierenversagens, außerdem muss erwähnt werden, dass COX-Hemmstoffe als Antipyretika das Auftreten von Infektionskrankheiten verschleiern können. Daher ist ein engmaschiges Monitoring von Körpergewicht, Nierengewicht, Serum- und Urinelektrolyten, renaler Prostaglandinausschüttung und Medikamentenspiegeln notwendig, um die Gefahren eines akuten Nierenversagens aber auch schwerwiegender intestinaler Komplikationen rasch zu erkennen. Ende der Neunziger Jahre wurde eine neue Substanzgruppe (Coxibe) entwickelt, die selektiv das COX-2 Isoenzym hemmt. Im Vergleich mit der Wirkung der konventionellen COX-Hemmer (NSAR), zeigen Coxibe kaum gastrointestinale Wirkungen, allerdings treten renale Nebenwirkungen wie akute Verschlechterung der Nierenfunktion mit Natrium-Retention, Ödeme, Hypertension und Hyperkaliämie gleichhäufig auf [DeMaria AN, Weir MR., 2003]. Rofecoxib, ein Vertreter dieser neuen Substanzgruppe, wurde 2004 vom Markt zurückgenommen, nachdem in einer Präventionsstudie ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko aufgezeigt werden konnte [Bresalier, RS et al. 2005]. Metaanalysen aus jüngster Zeit zeigen jedoch, dass unter allen nicht-steroidalen Antirheumatika (konventionelle und selektive COX-2-Hemmer) das kardiovaskuläre Risiko leicht erhöht ist (Ausnahme: Naproxen) [Trelle, Reichenbach, et al. 2011]. Das Nutzen-Risiko-Verhältnis der sich noch auf dem Markt befindlichen Coxibe (Celecoxib, Etoricoxib) wird weiterhin als positiv bewertet. Die Risikounterschiede für gastrointestinale Komplikationen fallen bei einem Vergleich mit konventionellen COX-Hemmern bei kurzfristiger Anwendung (<1,5 Jahre) deutlich zu Gunsten der Coxibe aus. Bei Patienten mit Risikofaktoren für das Auftreten gastrointestinaler Komplikationen (z.B. frühere gastrointestinale Schädigung) kann die Anwendung von Coxiben in Betracht gezogen werden. Bei der Anwendung selektiver COX-2-Hemmer, aber auch konventioneller NSAR, ist insbesondere bei Patienten mit ischämischer Herzkrankheit in der Vorgeschichte eine strenge Indikationsstellung selbstverständlich.

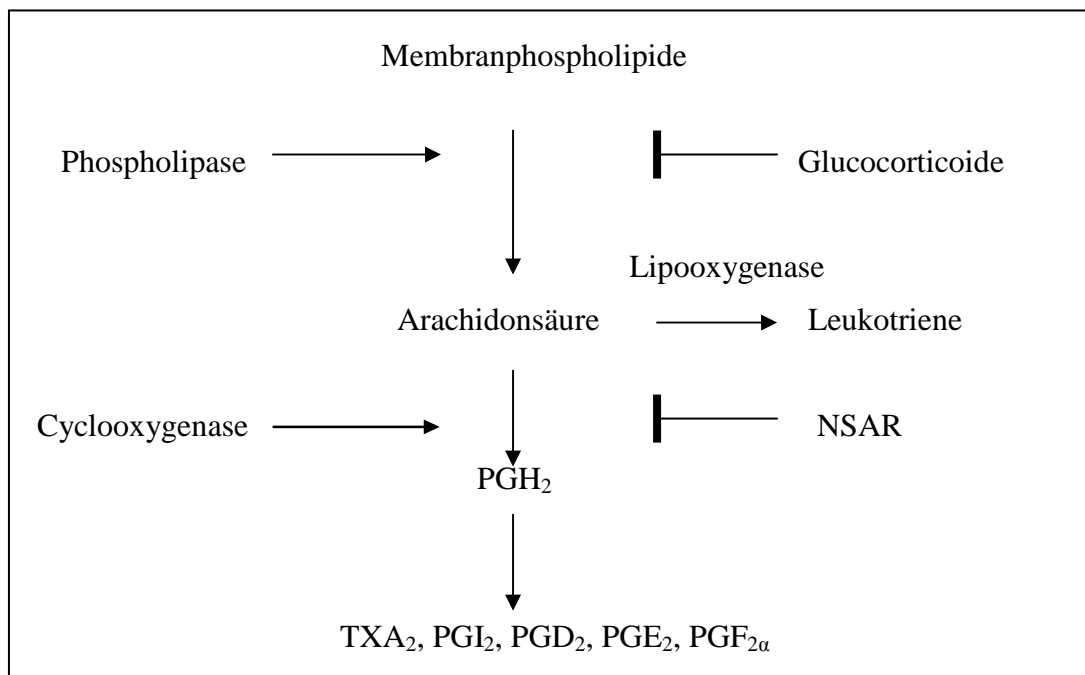


---

## 1.6 Synthese und Funktion der Prostaglandine

Im Allgemeinen handelt es sich bei Prostaglandinen um hormonähnliche Substanzen aus der Gruppe der Eicosanoide, die in ihrer Wirkung allerdings eine kleinere Reichweite und kürzere Wirkdauer als Hormone besitzen und somit vorwiegend lokal wirken. Im Gegensatz zu Hormonen werden sie nicht in spezifischen Drüsenzellen synthetisiert, sondern sie können in vielen Zellen entstehen, und sind somit auch in fast allen Organen des Körpers nachzuweisen. Prostaglandine stimulieren Entzündungsprozesse, regulieren den Blutfluss zu bestimmten Organen, kontrollieren den Ionen-transport durch Membranen, modulieren die synaptische Übertragung und lösen den Schlaf aus [Streyer 2000]. Die Prostaglandine sind in ihrer Wirkung sehr vielfältig, teilweise auch gegensätzlich. Zum Beispiel ist  $\text{PGE}_2$  in einigen Gefäßen ein Vasodilatator und in anderen ein Vasokonstriktor [Lawrence et al., 1992; Coleman et al., 1990]. Zusätzlich haben sie u. a. Einfluss auf die Wirkung der Katecholamine, den Tonus der glatten Muskulatur, den Knochenstoffwechsel, das autonome Nervensystem, das Immunsystem, die Zellwanderung (Leukozyten) und das kardiovaskuläre System. Sie hemmen die Thrombozytenaggregation und die Magensaftsekretion. Diese unterschiedlichen Wirkungsweisen lassen sich durch unterschiedliche Rezeptortypen erklären, an welchen die Prostaglandine wirken. Man unterscheidet je nach Affinität zu den verschiedenen PG die 5 Rezeptorhaupttypen: DP, FP, IP, TP und EP [Kiryama M. et al. 1997]. Die EP-Rezeptoren lassen sich nochmal in 4 Subtypen EP1-EP4 untergliedern. Die genannten Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt, die entweder die Adenylatcyclase stimulieren, (IP, DP, EP2, EP4), bzw. hemmen (EP3) oder die Phospholipase C aktivieren (EP1, TP, FP). Bei den Prostaglandinen handelt es sich um die Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels. Nahezu alle Organe sind zur Prostaglandinsynthese befähigt. Die Niere ist eines der Organe welches einerseits sehr aktiv Prostanoid synthetisiert, gleichzeitig aber auch ein wichtiger biologischer Angriffspunkt für Prostanoid ist. Auf bestimmte chemische, physiologische, pathophysiologische und pharmakologische Stimuli hin kann die Prostaglandinsynthese aktiviert werden. Dabei wird die membrangebundene Phospholipase  $A_2$  aktiviert. Diese setzt Arachidonsäure frei. Der Hauptanteil des Arachidonsäuremetabolismus in der Niere wird über das Enzym Cyclooxygenase bestimmt. Sie bildet aus der Arachidonsäure das zyklische Endoperoxid  $\text{PGH}_2$  [Vane et al, 1971], hieraus kommt es

zur weiteren Bildung der klassischen Prostaglandine ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), des Prostacyclins und des Thromboxans [Samuëllson et al, 1983]. Aus einem Teil der Arachidonsäure können durch ein weiteres Enzym, die Lipooxygenase, Leukotriene gebildet werden [Peskar 2001]. Die Synthese von  $\text{PGE}_2$  kann über 3 Formen der PGE-Synthase erfolgen. Über die membrangebundenen PGE Synthasen 1 und 2 (mPGES-1, mPGES-2) oder über die cytosolische PGE Synthase (cPGES). Die cPGES existiert ubiquitär und ist in ihrer Funktion auch eng an die ubiquitär vorkommende COX-1 gekoppelt. Die mikrosomalen PGE-Synthasen sind in ihrer Funktion an die COX-2 gekoppelt und werden durch proinflammatorische Mediatoren reguliert bzw. durch antientzündliche Stoffe wie Glukokortikoide unterdrückt [Murakami M. et al, 2002]. In Abbildung 2 ist der Arachidonsäurestoffwechsel schematisch dargestellt.



**Abbildung 2** Arachidonsäurestoffwechsel, PG: Prostaglandin, TX: Thromboxan

Die Cyclooxygenase existiert in zwei Isoformen. Lange Zeit nahm man an, dass die Cyclooxygenase 1 (COX-1) konstitutiv in allen Körpergeweben exprimiert wird und die Cyclooxygenase 2 (COX-2) hauptsächlich in Entzündungszellen [Lundgren DW, et al 1997]. Erst in letzter Zeit entdeckte man, dass doch auch COX-2 in einigen Organen,

wie Niere und Rückenmark, konstitutiv gebildet wird und somit dort wichtige physiologische Funktionen wahrnimmt [Scholz 2003, Cheng et al. 2002], die dann folglich durch COX-2-Hemmer negativ beeinflusst werden.

COX-1 lokalisierte man v. a. in mesangialen Zellen, im Endothel der Arteriolen, in den parietalen Epithelzellen der Bowmanschen Kapsel und im kortikalen, sowie medullären Sammelrohr. Die COX-2-Expression ließ sich dagegen hauptsächlich in den interstitiellen Zellen des Nierenmarks, in den Zellen der aufsteigenden Henle-Schleife, in den Gefäßen und Podozyten der Glomerula nachweisen [Breyer u. Harris 2001]. In der Niere ist die COX-2-Expression v. a. in Macula densa Zellen und cTAL Zellen nachgewiesen worden [Nantel et al. 1999, Kömhoff et al. 2000]. Macula densa Zellen sind am tubuloglomerulären Feedback (Regulation des Gefäßtonus der afferenten Arteriolen) und der Regulation des Salzhaushaltes beteiligt, indem sie die luminale Salz-, bzw. Chloridkonzentration messen [Persson et al. 1991, 2004]. Bei Zunahme der NaCl-Konzentration im distalen Konvolut kommt es über eine Sensorfunktion der Macula densa zu einer Reduktion der glomerulären Filtrationsrate desselben Nephrons. Hierdurch erfolgt eine Verminderung der glomerulären Filtrationsrate.

## **1.7 Fragestellung**

Im Rahmen der Furosemid-ähnlichen Salzverlusttubulopathie entsteht in der Niere ein hypoosmolares Salzmilieu und es kommt zu einer vermehrten Ausschüttung von PGE<sub>2</sub>. In der Hemmung der erhöhten Prostaglandinspiegel liegt momentan der einzige Therapieansatz der Erkrankung, mithilfe nicht-selektiver bzw. selektiver COX-Hemmer. In früheren Arbeiten konnte mehrfach ein Zusammenhang zwischen Salzzug und Prostaglandinanstieg nachgewiesen werden. Bisher existieren hauptsächlich Daten, die in Untersuchungen mit c-TAL- oder Macula densa Zellen gewonnen wurden [Cheng et al. 2000]. Es wird jedoch in der Literatur auch mit m-TAL-Zellen gearbeitet [Yang 2003].

Ein Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines Zellmodells den Zusammenhang zwischen einem hypoosmolaren Milieu und einer Zunahme der PGE<sub>2</sub>-Synthese zu untersuchen. Die Hypoosmolarität wurde einerseits durch salzarme Stimulationsmedien hervorgerufen, andererseits durch Blockade der verantwortlichen Ionenkanäle durch

Furosemid und hieraus resultierender Hypoosmolarität. Wir entschieden uns für primär kultivierte Epithelzellen, präpariert aus dem m-TAL-Abschnitt von Schweinenieren, da hier die untersuchten Transportsysteme exprimiert werden. Physiologisch gesehen kommt der Schweineniere eine hohe Homologie zur menschlichen Niere zu [Kim HJ et al. 2006]. Zudem sind Schweinenieren kostengünstig und in ausreichender Zahl zu erhalten. Gleichzeitig sollten Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen der PGE-Synthese gewonnen werden, insbesondere darüber ob die COX-2 tatsächlich die relevante Cyclooxygenaseform für die PGE<sub>2</sub>-Synthese darstellt. Der genaue Mechanismus zwischengeschalteter Faktoren ist immer noch nicht ausreichend geklärt. Eine Beteiligung der MAP Kinasen wird diskutiert. Das Modell sollte leicht verfügbar und für klinische Fragestellungen einsetzbar sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Häufig verwendete Lösungen

#### PBS-Puffer:

11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

79,48 g NaCl

1,9 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,9 g KCl ad 1 l Aqua dest. (destilliertes Wasser)

pH: 7,4

#### TTBS:

15,76 Tris-HCl

0,05% Tween (250 µl pro 500 ml TBS) ad 1000 ml MQ-H<sub>2</sub>O (Millipore-H<sub>2</sub>O)

pH: 7,5

#### 50x TAE-Puffer:

242 g TRIS Base (2M)

57,1 ml Eisessig (100%)

100 ml EDTA (0,5M pH 8)

ad 1 l MQ-H<sub>2</sub>O

### 2.2 Isolierung und Kultivierung von m-TAL Zellen aus Schweinenieren

Da zur Zeit noch kein Standardmodell des m-TAL existiert, verwendeten wir für unsere Versuche primär kultivierte Epithelzellen, präpariert aus dem medullären Anteil der Schweineniere.



## 2.3 Widerstandsmessung

### Materialien und Geräte:

- PBS-Puffer
- Membraneinsätze
- Messkammer World Precision Instruments, Sarasota, USA
- EVOM Widerstands-/  
Spannungsmessgerät World Precision Instruments, Sarasota, USA

Zur Charakterisierung der gewonnenen Zellen führten wir Messungen des transepithelialen Widerstands durch. Hierfür verwendeten wir eine spezielle Messkammer. Auf Membraneinsätzen wurden die Zellen ausgesät. Hiernach wurde täglich eine Messung des transepithelialen Widerstands durchgeführt und die Messwerte in einem Diagramm aufgetragen. Zur Widerstandsbestimmung wurde der Membraneinsatz in eine mit 3 ml PBS-Puffer gefüllte EndOhm-12 Messkammer eingebracht. Die Messung erfolgte mit dem EVOM Widerstands-/Spannungsmessgerät.

## 2.4 Immunhistochemische Untersuchungen

### 2.4.1 APAAP

Zur Darstellung der Expression der Prostaglandin-E-Rezeptoren (EP-Rezeptoren) und der Enzyme COX-1 und COX-2 mittels spezifischer Antikörper wurde die Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP) verwendet [Cordell et al., 1984]. Bei der APAAP-Methode wird der zu untersuchende Gewebeschnitt mit einem IgG-Antikörper inkubiert, der gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist (sog. Primärantikörper). Danach wird ein zweiter IgG-Antikörper im Überschuss hinzugefügt, der gegen einen Teil (Fc-Teil) des Primärantikörpers gerichtet ist (sog. Brückenantikörper). Anschließend wird ein dritter IgG-Antikörper hinzugefügt, dessen zwei Fab-Teile mit Alkalischer Phosphatase verbunden sind (sog. Sekundärantikörper). Damit er an den Brückenantikörper bindet, muss der Sekundärantikörper von derselben Spezies wie der Primärantikörper sein. In einer nun folgenden Enzymreaktion wird das Antigen durch einen Farbstoff sichtbar gemacht. Dieser entsteht durch Hydrolisierung

von Naphtolbiphosphat durch die Alkalische Phosphatase zu Phosphaten und Phenolen. Letzere reagieren wiederum mit farblosen Diazoniumsalzen zu Azofarbstoffen.

### Materialien und Geräte

- Deckgläser
- Gewebekultur Deckgläser LabTek, nunc, Naperville, Illionois
- PBS
- EP1-Antikörper Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California
- EP2-Antikörper Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California
- EP3-Antikörper Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California
- EP4-Antikörper Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California
- COX 1-Antikörper Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California
- COX 2-Antikörper Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California
- monoklonaler Maus anti-Kaninchen-Antikörper Dako, Kopenhagen, Dänemark
- polyklonaler Kaninchen anti-Maus-Antikörper Dako, Kopenhagen, Dänemark
- APAAP Komplex Dako, Kopenhagen, Dänemark
- Entwicklerlösung Faramount, DAKO, Kopenhagen, Dänemark

### Protokoll:

Die immunhistochemische Untersuchung mittels APAAP wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierten m-TAL-Zellen wurden in den Zellkulturschalen auf Deckgläsern kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4%igem PFA in PBS für 30 Minute bei Raumtemperatur fixiert. Die Schnitte wurden mit dem primären Antikörper 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Schnitte intensiv mit PBS-Puffer gewaschen, bevor die Inkubation des Schnittes mit dem Brückenantikörper für 30 Minuten erfolgte. Nach erneutem Waschen wurde der Schnitt für 30 Minuten mit dem APAAP-Komplex überschichtet. Für die Entwicklung wurde die Entwicklerlösung hinzugegeben. Das Spaltprodukt ergab mit Neufuchsin einen roten Niederschlag.



---

## 2.4.2 Immunfluoreszenz

### Materialien und Geräte

- Deckgläser
- Gewebekultur Deckgläser LabTek, nunc, Naperville, Illinois
- PBS
- Kaninchen-Anti-THP-Antikörper (1:50) Eigenentwicklung
- Ziege-Anti-Kaninchen IgG (FITC 1:200) Behring, Marburg, Germany  
(1:15.000 in 10% Ziegenserum)

Aus humanem Urin wurde das THP (Tamm-Horsfall-Protein) isoliert. Hieraus konnten wir ein Kaninchen-Anti-THP-Antikörper entwickeln, welches zur weiteren Identifizierung der Zellen eingesetzt wurde (durchgeführt von Dr. Markus Wegmann, Kinderklinik Marburg). Es wurden Gefrierschnitte (Dicke 4-6  $\mu\text{m}$ ) aus Schweinenieren hergestellt. Durch Azeton wurden diese auf Objektträgern fixiert und für die THP-Immunfluoreszenz mit 2 ml Kaninchen-Anti-THP-Antikörper (1:50) pro Schnitt für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Waschung der Objektträger mit PBS wurden 2 ml von dem mit fluoreszierendem Farbstoff konjugierten Ziege-Anti-Kaninchen IgG (1:200) zugegeben. Die Objektträger wurden erneut für 45 min bei 37°C inkubiert. Hiernach erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS, bevor die Gefrierschnitte eingedeckelt wurden. Die Färbungen wurden sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

## 2.5 Zusammensetzung der verwendeten Stimulationslösungen

Beim aBS ist die NaCl-Aufnahme über den NKCC2-Transporter blockiert, hierdurch kommt es zu einer intrazellulären Abnahme der NaCl-Konzentration. Um die Elektrolytverhältnisse in vitro zu simulieren wurden unterschiedliche Kulturmedien verwendet.

Bezeichnung	Na <sup>+</sup> Konzentration mM	Cl <sup>-</sup> Konzentration mM	Osmolarität mosmol/kg H <sub>2</sub> O
Standard	142	139	290
Hypo 2	88	85	200
Iso Hypo 2	88	85	290 (durch Zugabe von Mannitol)

**Tabelle 3** Elektrolytzusammensetzung und Osmolarität der Stimulationslösungen

Referenzwert war hierbei die Lösung „Standard“, welche dem Zellkulturmedium entspricht. Mit einer Osmolarität von 290 mosmol/kg H<sub>2</sub>O, einer Na<sup>+</sup>-Konzentration von 142 mM und einer Cl<sup>-</sup>-Konzentration von 139 mM ähnelt sie diesbezüglich der Zusammensetzung von Blutplasma.

Bei der Lösung „Hypo 2“ verwendeten wir ein Außenmedium mit einer stark verminderten NaCl-Konzentration und hierdurch erniedrigten Osmolarität unter der Annahme, dass sich hierdurch auch eine intrazelluläre Verarmung ergibt. Die Na<sup>+</sup>-Konzentration (88 mM) und die Cl<sup>-</sup>-Konzentration (85 mM) sind im Vergleich zur Lösung „Standard“ erniedrigt. Hierdurch reduziert sich die Osmolarität der Lösung auf 200 mosol/kgH<sub>2</sub>O.

Um zwischen dem Osmolaritätseffekt und dem Elektrolyteffekt zu unterscheiden, gaben wir der Lösung „HYPO 2“ 265 µl Mannitol (2 M) hinzu. Die entstandene Lösung „ISO HYPO 2“ unterscheidet sich in der Osmolarität nicht von der Referenzlösung „Standard“, allerdings ist die Elektrolytkonzentration mit 88 mM Na<sup>+</sup> und 85 mM Cl<sup>-</sup> erniedrigt.

Die Lösung „Standard plus Furosemid“ enthält zusätzlich zum Zellkulturmedium 33,2 µl Furosemid, hinsichtlich Osmolarität und Elektrolytkonzentration gleicht sie der Lösung „Standard“. Durch Blockade des NKCC2-Transporters durch Furosemid wird die Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Aufnahme der Zellen blockiert und eine intrazelluläre Verarmung an diesen Elektrolyten hervorgerufen.

## 2.6 Stimulation der m-TAL Zellen

### Materialien und Geräte

- 6-well-Platten und 10 ml Petrischalen mit dicht gewachsenen m-TAL-Zellen

### Medien

- Grundmedium (GM) 22,3 ml DMEM/HAM'S F 12+27,7 ml MQ
- Standard 50 ml GM+750 µl NaCl (5,37M)
- Hypo 2 50 ml GM+250 µl NaCl (5,37M)
- ISO Hypo 2 50 ml GM+ 265 µl Mannitol (2M)

### Inhibitoren

- p38 MAPK Inhibitor SB 203580 1 mg/ml Calbiochem, Schwalbach
- Lasix 500 µM Hoechst MarionRoussel, Frankfurt  
gelöst in DMSO (Dimethylsulfoxid)

### Protokoll:

Die mit den präparierten Zellen bewachsenen Schalen und Platten wurden mit PBS gewaschen. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Experimente durchgeführt. Pro well einer 6-well-Platte wurden jeweils 2 ml, pro Schale jeweils 10 ml der Stimulationslösungen eingesetzt und 24 h im Zellkulturschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium in Eppendorf Cups überführt, und die Proteinkonzentration im ELISA bestimmt. Aus den Zellen der 6-well Platten wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, mittels RT-PCR amplifiziert und die Expression mittels der Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Zellen aus den Petrischalen wurden für Western Blot-Analysen verwendet.

## 2.7 PGE<sub>2</sub>-ELISA

Mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) wurde das entstandene PGE<sub>2</sub> gemessen. Es werden bestimmte Antigeneigenschaften des Prostaglandin E<sub>2</sub> ausgenutzt. An diese Antigene binden enzymgekoppelte Antikörper. Umso mehr Antikörper binden, umso mehr Indikatorfarbstoff kann das gebundene Enzym umsetzen und so die Menge an Prostaglandin anzeigen.

Materialien und Geräte:

- ELISA-Platte (96 wells)
- Probenpuffer
- Waschpuffer
- Antikörper
- Reinstwasser

Protokoll:

Alle verwendeten Komponenten waren Bestandteil des EIA Kits von Amersham. Das Pufferkonzentrat wurde mit Reinstwasser auf ein Endvolumen von 500 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Konjugat in 6 ml des Probenpuffers gelöst und dann 2 ml Konjugat entnommen und nochmals 4 ml des Probenpuffers hinzugefügt. Die Antikörper wurden in 6 ml des Probenpuffers gelöst, anschließend wurden 2 ml der Antikörper entnommen und nochmals 4 ml Probenpuffer hinzugefügt. Für den Waschpuffer wurde das Waschkonzentrat mit MQ-H<sub>2</sub>O auf ein Endkonzentrat von 500 ml aufgefüllt.

Als nächstes erfolgte die Vorbereitung der Standards. Hierzu wurde 3,9 ml Probenpuffer in ein Kunststoffröhrchen gefüllt, anschließend wurden 100 µl der Standardstammlösung hinzugefügt und gemischt (320 pg/50 µl). In jedes Eppendorfgefäß (Überstand) wurde 500 µl Probenpuffer gegeben. Als nächstes wurde die Verdünnungsreihe erstellt, hierzu wurden 500 µl des 320 pg-Standards in das 160 pg-Gefäß gegeben und gemischt, dann wurden 500 µl entnommen und in das 80 pg-Gefäß gegeben, etc. Aus dem 2,5 pg-Gefäß wurden 500 µl verworfen. In die Vertiefungen B1 und B2 (nicht-spezifisch-bindende wells (NSB)) wurden je 100 µl Probenpuffer gegeben. Je 50 µl Probenpuffer wurden in die Standard-Vertiefungen pipettiert. Weiterhin wurden je 50 µl der entsprechenden Standards in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert. Je 50 µl jeder zu bestimmenden Probe wurden in die restlichen wells gefüllt. Anschließend wurde in jedes well außer im Leerwert und NSB je 50 µl des vorbereiteten Antikörpers gegeben und außer im Leerwert je 50 µl des verdünnten Konjugates. Danach wurde die zugedeckte Platte 1 Std auf dem Schüttler inkubiert. Nun wurden die wells 4x mit Waschpuffer gewaschen und dann sofort mit je 150 µl Substratlösung gefüllt. Die Platte wurde wieder 30 min auf dem Schüttler inkubiert und

---

als letztes die optische Dichte des entstandenen blauen Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 630 nm abgelesen. Das Protokoll wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 2.8 Gel-Elektrophorese

### Materialien und Geräte:

#### Trenngel:

- 3,33 ml 30%ige Acrylamid-Lösung Fertigprodukt von Sigma
- 2,5 ml Trenngelpuffer (36,3 g Tris-Base in 200 ml MQ, pH 8,8)
- 100 µl 10%ige SDS-Lösung
- 4 ml MQ-H<sub>2</sub>O
- 50 µl APS-Lösung (1 g Ammonium-Persulfat in 10 ml MQ-H<sub>2</sub>O)
- 10 µl TEMED
- pH: 8,8

#### Sammelgel:

- 0,67 ml 30%ige Acrylamid-Lösung Fertigprodukt von Sigma
- 1,25 ml 4x Sammelgelpuffer (3g Tris-Base in 50 ml MQ-H<sub>2</sub>O, pH 6,8)
- 50 µl 10%ige SDS-Lösung
- 3 ml MQ-H<sub>2</sub>O
- 25 µl APS-Lösung (1 g Ammonium-Persulfat in 10 ml MQ-H<sub>2</sub>O)
- 4 µl TEMED
- pH: 6,8

#### 2xLysepuffer:

- 50 ml Tris-SDS pH 6,8
- 4 g SDS
- 20 ml Glycerol
- 10 ml Mercaptoethanol
- 500 µl Bromphenolblau 0,25% Roth, Karlsruhe
- ad 100 ml H<sub>2</sub>O

---

Nach Herstellung der Gele wurden die Proteinlösungen (je 20 µg) mit 2x Lysepuffer im Verhältnis 1:1 gemischt, für 5 min bei 95°C inkubiert und dann bei 10.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde aufgetragen.

Proteinmarker (full range Rainbow Molecular weight marker RPN 800, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, England) wurden in einem 10%igen SDS Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (ca. 110 min, 120 V, offene Ampèrezahl).

## 2.9 Western Blot

### Materialien und Geräte:

Kathodenpuffer:

- Tris-HCl 3,94 g
- Norleucin 5,24 g ad 1 l MilliQ-H<sub>2</sub>O, pH 9,4 einstellen

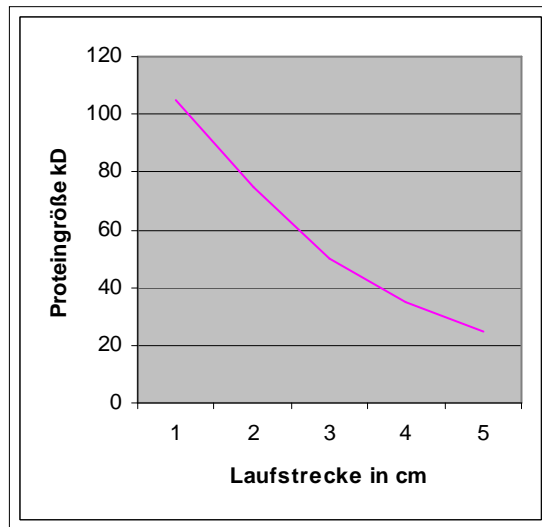
Färbelösung:

- Methanol 500 ml
- Essigsäure 100 ml
- 1 Tablette Phast Gel Blue R (Coomassie Blue R-350)
- ad 1000 ml MQ-H<sub>2</sub>O

Entfärbelösung:

- Methanol 300 ml
- Essigsäure 100 ml
- ad 1000 ml MQ-H<sub>2</sub>O

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenn- vom Sammelgel gelöst und fünfminütig im Kathodenpuffer inkubiert und danach in einer Blotapparatur auf eine Membran übertragen (ca. 60 min, Voltzahl auf 100, Ampèrezahl offen). Das Gel wurde anschließend 60 min mit der Färbelösung inkubiert und dann 30 min mit Entfärbelösung gewaschen. Zur Markierung der Position der Referenzproteine wurde die Membran 1-3 min in Ponceau-S-Lösung inkubiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O gespült. Die Membran wurde über Nacht in 5% Magermilchpulver und 0,02% NaN<sub>3</sub> in PBS bei 4°C inkubiert. Die Ergebnisse wurden auf Millimeterpapier aufgetragen, Abb. 3. Die Proteingröße in kDA der Proteinstandards wurde in Bezug auf die Laufstrecke in cm abgelesen, dargestellt in Tabelle 4.



**Abbildung 3** Laufstrecke in cm in Bezug auf die Proteingröße in kDa

Laufstrecke in cm	Proteingröße in kD
1,7	68
2,3	58
3,5	50
4,7	35
4,5	25

**Tabelle 4** Laufstrecke der Standardproteine in cm in Bezug auf die Proteingröße in kDa

## 2.10 RNA Isolierung und Quantifizierung aus kultivierten m-TAL-Zellen

### Materialien und Geräte

- 6-well-Platten und 10 ml Petrischalen mit dicht gewachsenen m-TAL-Zellen
- Biofuge fresco Heraeus, Hanau
- Peq GOLD RNA Pure<sup>TM</sup> PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
- Chloroform Merck, Darmstadt
- Isopropanol Sigma, Seelze

- 
- |                                 |                   |
|---------------------------------|-------------------|
| - Ethanol 70%                   | Sigma, Seelze     |
| - TE-Puffer pH 8,0, RNase frei  | Ambion, Darmstadt |
| - RNase freies H <sub>2</sub> O | Gibco, Karlsruhe  |

### Protokoll

Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen im Brutschrank wurde die RNA isoliert. Dazu wurden die Zellüberstände abgesaugt, die Zellen mit je 1 ml Peq GOLD RNA Pure<sup>TM</sup> pro Vertiefung von den Schalen gelöst und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Die Proben wurden 5 min auf Eis gekühlt, und anschließend wurden zu jeder Probe 150 µl Chloroform pipettiert. Nach 15 sec vortexen wurden die Proben erneut 15 min auf Eis gestellt. Danach wurden sie 20 min bei 13000 U/min und bei 4°C zentrifugiert, wobei sich 3 Phasen abtrennten. Eine untere gelbe Phenol-Chloroformphase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA reichert sich in der wässrigen oberen Phase an, die DNA und Proteine befinden sich in der Inter- und Phenolphase. Nach Abnahme der wässrigen Phase wurde ein Volumenanteil Isopropanol dazugegeben. Nach 15 sec Mischen erfolgte die RNA-Fällung über 30 min bei -20°C. Anschließend wurden die Proben erneut 30 min mit 13000U/min bei 4°C zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die RNA befindet sich als Pellet im unteren Gefäß. Die Pellets wurden zweimal mit je 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 10 min abgedeckt getrocknet. Zuletzt wurden die Pellets in jeweils 10 µl RNase freiem TE-Puffer (pH 8,0) gelöst danach auf 70°C erhitzt und erneut auf Eis gestellt. Um die Konzentration der RNA zu messen wurde ein Spektralphotometer verwendet. Die Proben wurden mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O 1:100 verdünnt und in Quarzküvetten gefüllt. Anschließend wurde von jeder Probe die UV-Absorption bei den Wellenlängen 230, 260 und 280 nm gemessen. Aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm konnte die Reinheit abgeschätzt werden. Sie sollte bei reiner RNA bei 2 liegen. Die RNA wurde im Verhältnis 1 µg/7,5 µl abgefüllt und bei -80°C gelagert.



---

## 2.11 DNase-Verdau

### Materialien und Geräte:

DNase Mastermix:

- DNase I 1000 units (1u/ $\mu$ l) Gibco, Karlsruhe
- 5x Puffer Gibco, Karlsruhe
- EDTA 10mM, pH 8,0 Sigma, Seelze

Um evtl. vorhandene DNA-Kontamination welche die PCR-Analysen verfälschen könnte zu minimieren wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Zu jeder Probe wurden 2  $\mu$ l DNase Mastermix zugegeben, gemischt und bei 37°C für 15 min inkubiert. Zum Abstoppen der DNase Reaktion wurde zu jeder Probe 1  $\mu$ l 10 mM EDTA hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation bei 70°C für 10 min wurden die Proben abzentrifugiert und auf Eis gestellt.

## 2.12 Reverse Transkription

Zum Nachweis der verschiedenen Proteine auf mRNA Ebene führten wir die RT-PCR durch. Hierfür musste die mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgt mit Hilfe einer Reversen Transkriptase und oligo-dT als Primer.

### Materialien und Geräte:

oligo-dT 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l Invitrogen, Karlsruhe

RT-Mastermix:

- 2  $\mu$ l 5fach Puffer
- 1  $\mu$ l dNTP (10mM)
- 2  $\mu$ l DTT (0,1M)
- 1  $\mu$ l MQ-H<sub>2</sub>O
- 1  $\mu$ l SuperScript™ II
- 1  $\mu$ l RNasin® (RNase Inhibitor) (40 U/ $\mu$ l)

Protokoll:

Zu der RNA-Probe aus dem DNase-Verdau (11 µl) wurde 1 µl oligo-dT gegeben. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 70°C, danach kamen die Proben auf Eis und wurden abzentrifugiert. 8 µl des RT-Mastermixes wurden hinzugefügt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben für 50 min bei 42°C und für 5 min bei 95°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Proben erneut abzentrifugiert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

**2.13 PCR**

DNA-Abschnitte können mittels der PCR amplifiziert werden. Hierzu müssen die DNA-Abschnitte von zwei bekannten DNA-Sequenzen (Primer) eingerahmt sein. Die Stränge der Ziel-DNA werden in Einzelstränge getrennt, die Primer lagern sich an. Hieraus synthetisiert die DNA-Polymerase neue DNA-Stränge. Dieser Zyklus wird mit derselben Reaktionsmischung 20-40-mal wiederholt, so dass es zu einem exponentiellen Anstieg der Produkte kommt.

Produkt	Forward	Reverse	Produktgröße
β-ACTIN	CCCATCTACGAGGGGTACG	TTGGCGTAGAGGTCCTTCC	400 bp
COX1	CTCACAGTGCGTTCCAACC	CCATCCTTAAAGAGCCGTAGG	405 bp
COX2	CAGAGCCCCTCCGTGC	TTGAGTGTCTTTGGCTCTCG	395 bp
NKCC2	AGGCCTGTGCAAGGACAAC	CCCAGTTCACATCTGGCTTC	408 bp
ROMK	AGCCCTTTCTTCCACATGGC	TCATAGCCTCTCTTCATCCTG	305 bp
mPGES-1	GGAAGAAGGCTTTGCCAA	CAGGTAGGCCACGGTGTGTA	427 bp

**Tabelle 5** Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer

---

### Materialien und Geräte

- |                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| - PCR-Softtubes 0,2 ml            | Biozym, Hess. Oldendorf           |
| - PCR T-Gradient Cycler           | Biometra, Göttingen               |
| - 2µl cDNA                        |                                   |
| - Expand High Fidelity PCR System | Roche, Basel                      |
| - Forward-Primer (10µM)           | Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien |
| - Reverse-Primer (10µM)           | Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien |
| - dNTP (2µM)                      | PHARMACIA, Freiburg               |
| - RNase freies H <sub>2</sub> O   | Gibco, Karlsruhe                  |
| - Taq DNA Polymerase (5 U/µl)     | Sigma, Steinheim                  |

### Protokoll

Alle Reagenzien wurden auf Eis gehalten bzw. pipettiert. Zu 2µl cDNA-Probe in 1:10 Verdünnung wurden 11,85 µl RNase freies H<sub>2</sub>O, 2 µl 10fach PCR-Puffer, 2 µl dNTP (2µM), 1 µl F-Primer, 1 µl R-Primer und 0,15 µl Polymerase gegeben und gemischt, so dass das Endvolumen 20 µl betrug. Anschließend durchliefen die Proben in der PCR-Maschine 5 min bei 95°C, sodann 35 Zyklen zu 30 s bei 95°C, 30 s bei 56°C und 2 min bei 72°C, danach 7 min bei 72°C und wurden abschließend auf 4°C abgekühlt.

## **2.14 Auftrennung des PCR-Produktes im Agarosegel**

Die durch PCR angereicherten DNA-Sequenzen wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Je kleiner die Fragmente sind (gemessen in Basenpaaren), desto weiter wandern sie im Gel. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Proben zu erhalten, wurde β-Actin als Referenz verwendet. β-Actin ist ein Strukturprotein und Bestandteil des Zytoskeletts in allen eukaryoten Zellen. Längenstandard war ein 100 base-pair ladder.

### Materialien und Geräte

- |                            |                  |
|----------------------------|------------------|
| - Gießapparatur, Easy-Cast | PEQLAB, Erlangen |
| - Gelkammer, EASY-Cast     | PEQLAB, Erlangen |
| - TAE-Puffer               |                  |

- 
- 1%iges Agarosegel:
    - 1 g Agarose
    - 100 ml TAE-Puffer Sigma, Seelze
    - 1  $\mu$ l Ethidiumbromid (0,5  $\mu$ g/ml) Roth, Karlsruhe
  
  - 6-fach Probenpuffer:
    - Bromphenolblau 0,25% Roth, Karlsruhe
    - Xylene cyanol ff 0,25% Sigma, Steinheim
    - Sucrose (w/v) 40% Sigma, Steinheim
    - in MQ-H<sub>2</sub>O
  - DNA-Standard:
    - 100  $\mu$ l Base-Pair Ladder (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) Amersham Biosciences, Buckinghamshire (GB)

### Protokoll

Nach Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde 1  $\mu$ l Ethidiumbromid hinzugegeben. Das erstarrte Gel wurde in der Gelkammer positioniert, und mit TAE-Puffer bis knapp über das Gel befüllt. Nach Zugabe von Probepuffer zum PCR-Produkt wurden 10  $\mu$ l des Gemisches aus Probenpuffer und PCR-Produkt in die Probentaschen gegeben, außerdem wurden 7  $\mu$ l DNA-Standard in die beiden äußeren Probentaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 150 V durchgeführt.

Durch Interkalation von einzelnen Ethidiumbromid-Molekülen zwischen die Basen der DNA verändert sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid, und die Fluoreszenz der Substanz wird bei Anregung mit UV-Licht erhöht. Hierdurch wird das Wanderverhalten der DNA-Produkte sichtbar gemacht.

Die semiquantitative Analyse der Expression der mRNA wurde mittels NIH ImageJ durchgeführt. Hierfür wurden die PCR-Agarosegele digital aufgenommen, in Graustufen-Bilder gewandelt und die Intensität der DNA-Banden mittels ImageJ integriert und auf die korrespondierende  $\beta$ -Actin-Bande normiert.

## 2.15 Statistik

Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) dargestellt. Die Signifikanz p wurde bei den Zwei-Gruppen-Vergleichen mittels ungepaartem t-Test errechnet. Bei Mehr-Gruppen-Vergleichen erfolgte die Berechnung mittels univariater Analyse der Varianz (One-way-ANOVA). Zur Analyse der Signifikanz p wurde ein Post-Test unter Verwendung einer Bonferroni alpha-Korrektur durchgeführt.

---

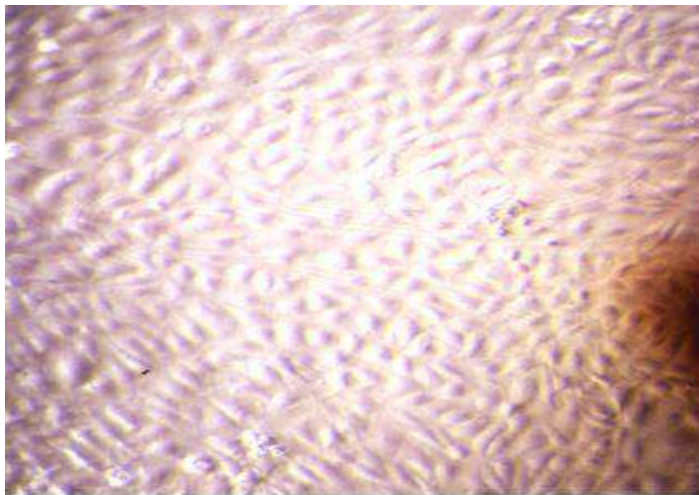
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung des mTAL

Zur Charakterisierung der kultivierten m-TAL-Zellen wurde die Morphologie der Zellen, die Expression des Tamm Horsfall Proteins, der Zellwiderstand des Epithels und die mRNA Expression von ROMK und NKCC2 untersucht.

#### 3.1.1 Morphologie des m-TAL

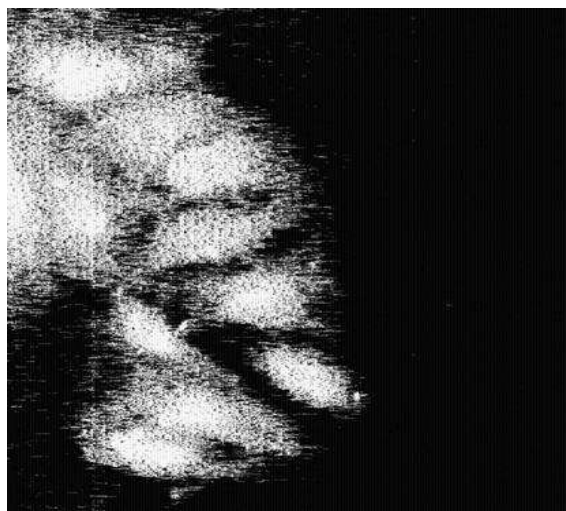
Der TAL beginnt in der Außenzone des Nierenmarks am Übergang der Innenzone in den Innenstreifen, steigt weiter in den Außenstreifen und dann in die Rinde auf. Um eine Verunreinigung des TAL mit Zellen aus der Umgebung zu vermeiden (z. B. distaler Tubulus) war es nötig, exakt die Zone der äußeren Medulla zu präparieren. Ein Identifizierungsmerkmal für die präparierten Zellen stellte deren Morphologie dar. Das charakteristische Erscheinungsbild der Epithelzellen unter dem Lichtmikroskop ist das sogenannte Pflastersteinrelief. Mit Hilfe dieser speziellen Struktur war es möglich die Zellen zu identifizieren, und etwaige Kontamination durch Fibroblasten, die eine spindelförmige Morphologie zeigen, zu erkennen. (Abb.4)



**Abbildung 4** Kultivierte konfluente Epithelzellen des TAL erscheinen mikroskopisch als Pflastersteinrelief. Das Epithel ist einschichtig und isoprismatisch, das Zytoplasma der Zellen erscheint hell.

### 3.1.2 Tamm Horsfall Protein-Expression

Ein weiteres Charakteristikum des TAL ist das Vorhandensein des THP (Tamm Horsfall Protein). Hierbei handelt es sich um ein Glycoprotein, das mit ca. 60 mg/dl das dominante Harnprotein darstellt. THP wird als das typische Markerprotein der dicken aufsteigenden Henle-Schleife angesehen. In früheren Arbeiten konnte mit Hilfe von In-situ-Hybridisierung und Immunogoldtechnik gezeigt werden, dass die THP-Synthese ausschließlich im TAL lokalisiert ist [Bachmann S et al, 1985]. Die Macula Densa-Zellen produzieren jedoch kein THP. THP wird überwiegend in den subapikalen Speicherkompartimenten sowie in der apikalen Membran der TAL Zelle [Bachmann S et al, 1985; Bachmann S et al, 1990] exprimiert und nur zu einem geringen Anteil in der basolateralen Membran. THP wird seit langem in Verbindung mit der spezifischen Transportleistung des TAL diskutiert. Untersuchungen von Nierenbiopsien und Harnproben bei Patienten mit antenatalem Bartter-Syndrom wiesen interessanterweise darauf hin, dass die THP-Produktion im Vergleich zu Gesunden signifikant vermindert ist [Schröter J et al, 1993]. Primär kultivierte m-TAL-Epithelzellen aus den Schweinenieren wurden auf Objektträgern vermehrt, fixiert und anschließend mit spezifischen Anti-THP-Antikörpern inkubiert. Mittels der Immunfluoreszenz wurde die Expression des THP nachgewiesen (Abb. 5).



**Abbildung 5** Nachweis der THP-Expression bei primär kultivierten TAL-Zellen mittels Immunfluoreszenz. Repräsentative Darstellung von n=3 Versuchen.

### 3.1.3 Widerstandsmessung des mTAL

Zur weiteren Charakterisierung des m-TAL wurden Widerstandsmessungen der isolierten Epithelzellen durchgeführt. Da das Epithel in diesem Abschnitt der Niere erfahrungsgemäß sehr dicht ist, z.B. durch tight junction-Proteine, wurde ein hoher elektrischer Widerstand erwartet. Der transepitheliale Widerstand stieg in den ersten 5 Tagen stark an, hiernach blieb der Widerstand bei Werten um ca.  $90 \Omega/\text{cm}^2$  stabil. Die von uns erhobenen Messwerte erscheinen realistisch, da auch in verschiedenen anderen Arbeiten Messwerte zwischen  $20\text{-}90 \Omega/\text{cm}^2$  erhoben worden waren [Berry CA et. al 1996]. In der Abbildung 6 ist der Widerstand in Bezug auf die Zeit (Zellkulturstage) dargestellt.



**Abbildung 6** Transepithelialer Widerstand von kultivierten Schweine-TAL-Zellen in  $\Omega/\text{cm}^2$  in Abhängigkeit der Zellkulturstage (n=6)

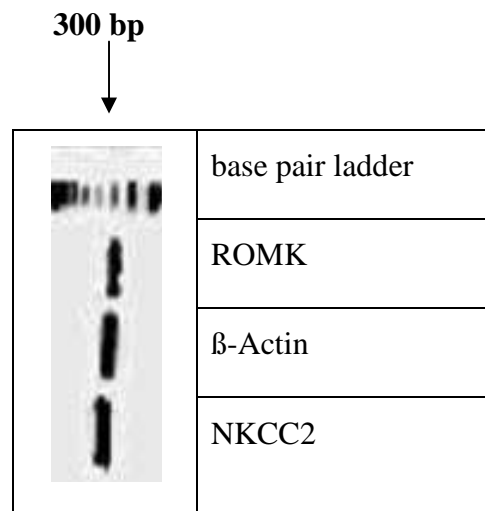


### 3.1.4 Expression des NKCC2-Cotransporters und des ROMK- Kanals

Ein weiteres Identifizierungsmerkmal des m-TAL war der Ionenkanal NKCC2, der in der Niere nur im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife exprimiert wird. Um die Funktionsfähigkeit des NKCC2 zu gewährleisten, ist ein konstanter Kaliumspiegel notwendig [Bleich, Schlatter, Greger 1990]. Für die Konstanzhaltung des Kaliumspiegels ist der Kaliumkanal ROMK zuständig. ROMK wird zwar entlang des gesamten Tubulus exprimiert, da er aber in unmittelbarem Zusammenhang mit der Funktion des NKCC2 steht, wurde er als weiterer Marker des TAL verwendet.

Mit Hilfe der RT-PCR (reverse-Transkriptase-PCR) konnte die DNA der charakteristischen Transportproteine des mTAL amplifiziert werden. Die mRNA-Expression wurde mit dem Gehalt von mRNA von  $\beta$ -Actin („housekeeping gene“) verglichen.

Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass nach Amplifikation der ROMK, NKCC2 und  $\beta$ -Actin c-DNA je eine Bande in der erwarteten bp-Größe detektiert werden konnte.

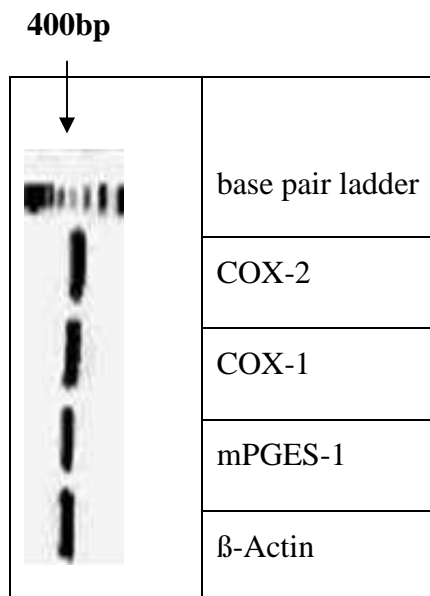


**Abbildung 7** PCR-Analyse der mRNA Expression von NKCC2, ROMK und  $\beta$ -Actin in isolierten TAL-Zellen der Schweineniere. Eine repräsentative Darstellung von n=3 Versuchen ist gezeigt.

### 3.2. RT-PCR der PGES-1 und von COX-1 und COX-2

Die Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 und die mPGES-1 stellen die Schlüsselenzyme der renalen Prostaglandinsynthese dar, daher wurde ihre Expression in den kultivierten m-TAL-Zellen untersucht. Die mRNA der jeweiligen Enzyme wurde in cDNA umgeschrieben, die Expression konnte dann mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgezeigt werden.

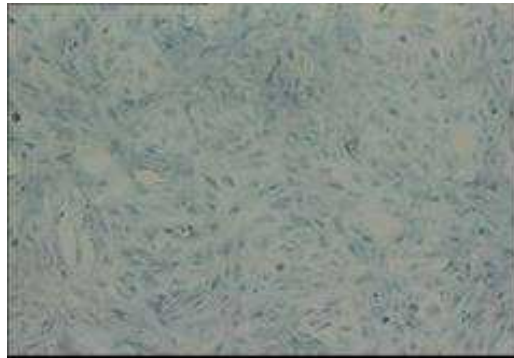
In Abbildung 8 sind die Amplifikationsprodukte für COX-1, COX-2, mPGES-1 und  $\beta$ -Actin dargestellt. Es konnte für das jeweilige Protein in der erwarteten Größe eine Oligonukleotid-Bande im Agarosegel nachgewiesen und sichtbar gemacht werden.



**Abbildung 8** PCR-Analyse der mRNA Expression von COX-2, COX-1 m-PGES-1 und  $\beta$ -Actin in isolierten TAL-Zellen der Schweineniere. Eine repräsentative Darstellung von n=3 Versuchen ist gezeigt.

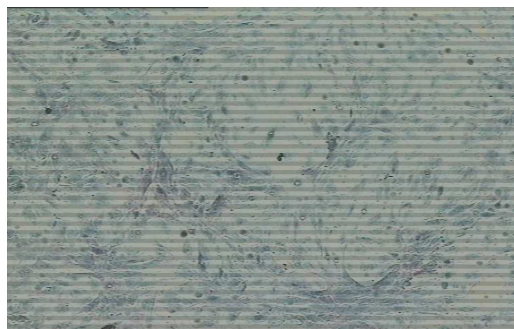
### 3.3 Immunhistochemische Untersuchung

Darüberhinaus wurde das Vorhandensein von EP-Rezeptoren untersucht. Es wird vermutet, dass PGE<sub>2</sub> die Salzresorption über die Bindung an den EP3-Rezeptor moduliert, der im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife und im Sammelrohr exprimiert wird [Breyer MD, 1998, Sep.]. Diese Proteine wurden ebenfalls als Typisierungsmerkmal für die TAL-Zellen hinzuzogen. Mit Hilfe von spezifischen, polyklonalen Antikörpern wurde das Vorhandensein der EP-Rezeptoren und der Enzyme COX-1 und COX-2 bei primär kultivierten TAL-Zellen der Schweineniere untersucht. In Abbildung 9 sind unbehandelte m-TAL-Zellen dargestellt.



**Abbildung 9** Als Referenzwert für die immunhistochemischen Untersuchungen dient die Darstellung der unbehandelten m-TAL-Zellen (n=6). Vergrößerung: 100-fach

Abbildung 10 zeigt die m-TAL Zellen nach Inkubation mit dem Antikörper gegen EP1, es ist kein positives Signal erkennbar.



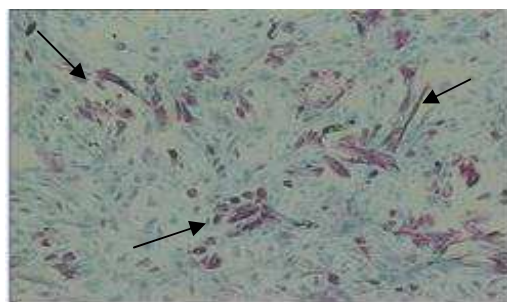
**Abbildung 10** m-TAL Zellen nach Inkubation mit Antikörper gegen EP1. Eine Rotfärbung als Hinweis auf Vorhandensein von EP1 bleibt aus, somit kein Hinweis auf das Vorhandensein von EP1 (n=5). Vergrößerung: 100-fach

Nach Inkubation mit Antikörper gegen EP2 zeigt sich eine vereinzelt Anfärbung von m-TAL Zellen, diese Reaktion ist in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11** Immunhistochemischer Nachweis des EP2-Rezeptors. Die unbehandelten m-TAL Zellen wurden mit dem Antikörper gegen den EP2-Rezeptor inkubiert, im Vergleich zu den unbehandelten m-TAL-Zellen in Abb. 8 zeigt sich eine leichte Anfärbung des Zellmaterials, die allerdings nicht alle Zellen betrifft (n=5). Vergrößerung: 100-fach

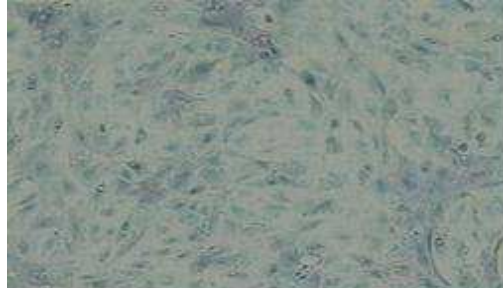
Als Hinweis auf eine starke Expression des EP3 Rezeptors, lässt sich nach Inkubation mit Antikörper gegen EP3 eine deutliche Rotfärbung der m-TAL Zellen aufzeigen, die in Abb. 12 dargestellt ist.



**Abbildung 12** Immunhistochemischer Nachweis des EP3 Antikörpers. Nach Inkubation der m-TAL-Zellen mit dem Antikörper gegen den EP3-Rezeptor zeigt sich eine deutliche Rotfärbung als Nachweis der Expression des EP3-Rezeptors, die allerdings nicht in allen Zellen auftritt (n=6). In der Abbildung ist die positive Reaktion durch Pfeile markiert. Vergrößerung: 100-fach

---

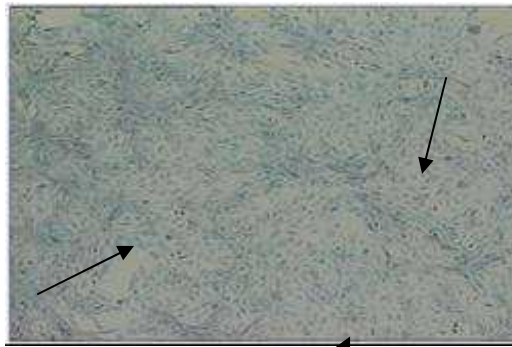
Nach Inkubation mit Antikörpern gegen den EP4-Rezeptor ergibt sich wie in Abb. 13 gezeigt kein Nachweis des Rezeptors in den m-TAL Zellen.



**Abbildung 13** m-TAL Zellen nach Inkubation mit Antikörpern gegen den EP4-Rezeptor. Es zeigt sich kein immunhistochemischer Nachweis des EP4 Antikörpers (n=6). Vergrößerung: 100-fach

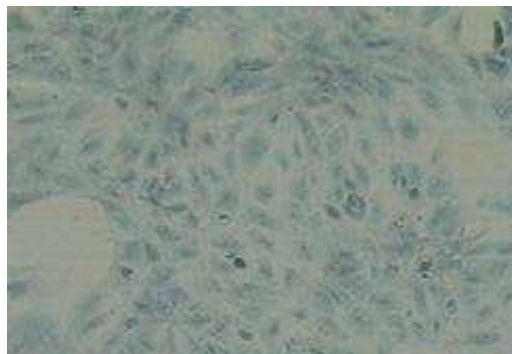
Die Expression des EP3-Rezeptors konnte in den m-TAL Zellen nach Inkubation mit dem Antikörper nachgewiesen werden. Es zeigt sich nicht in allen Zellen eine Rotfärbung. Dies kann daran liegen, dass der Rezeptor teilweise in zu geringen Mengen exprimiert wird und daher unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Für die Rezeptoren EP1 und EP4 ergibt sich kein Hinweis auf Expression. Dies kann daran liegen, dass die Rezeptoren nicht in den TAL-Zellen exprimiert werden, aber auch eine Expression unterhalb der Nachweisgrenze ist möglich. Nur eine Subgruppe der kultivierten Zellen reagierte mit dem Antikörper für EP 2, daher ist nicht von einer Expression auszugehen bzw. die Expression liegt unterhalb der Nachweisgrenze.

COX-1 konnte in den m-TAL Zellen nachgewiesen werden, dies ist durch die Rotfärbung nach Inkubation der kultivierten Zellen mit Antikörper für COX 1 in Abb. 14 aufgezeigt.



**Abbildung 14** Immunhistochemischer Nachweis von COX 1. Die Pfeile zeigen eine zwar geringe aber dennoch deutliche Rotfärbung, die allerdings nicht in allen Zellen auftritt (n=5). In der Abbildung ist die positive Reaktion durch Pfeile markiert. Vergrößerung 50-fach

Nach Inkubation mit Antikörper für die Cyclooxygenase COX-2 läßt sich kein positives Signal nachweisen (s. Abb. 15).



**Abbildung 15** m-TAL-Zellen nach Inkubation mit Antikörper für COX 2. Im Vergleich zu den unbehandelten mTAL-Zellen in Abb. 8, zeigt sich unter nicht stimulierten Bedingungen kein positives Signal (n=7). Vergrößerung: 200-fach

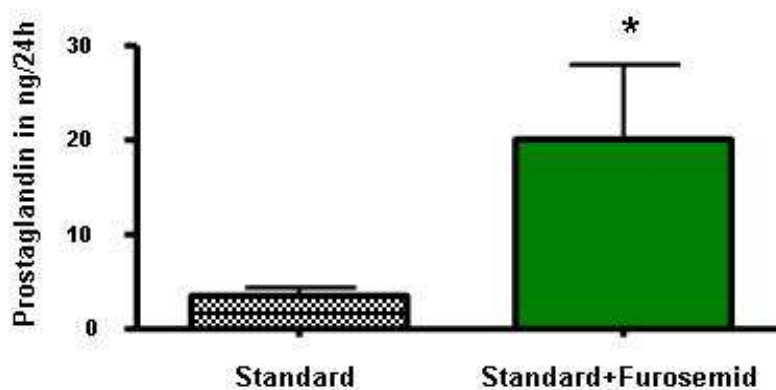
### 3.4 Effekte verschiedener Salzkonzentrationen auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese

PGE<sub>2</sub> ist das Hauptprostanoid, das von renalen Epithelzellen gebildet wird. Um den Einfluss der unterschiedlichen Salzkonzentrationen auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese zu untersuchen, wurden die m-TAL-Zellen mit folgenden Lösungen stimuliert: Medium „Standard“ repräsentiert die physiologischen Bedingungen, Medium „Standard+Furosemid“ repräsentiert ein intrazellulär salzarmes Milieu, hervorgerufen

durch Hemmung des NKCC2. Medium „Hypo 2“ entspricht ebenfalls hypoosmolaren Milieu. Medium „ISO HYPO 2“ stellt ein osmotisch ausgeglichenes Medium dar, welches allerdings im Salzgehalt erniedrigt ist. In den Zellüberständen wurde die PGE<sub>2</sub>-Konzentration mittels ELISA gemessen.

### 3.4.1 Stimulation mit der Lösung Standardlösung plus Furosemid

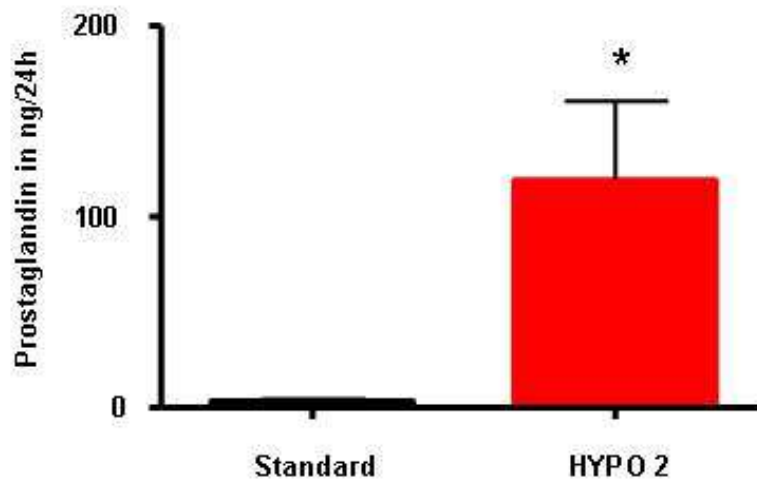
Kontrollzellen (Standard) bilden über 24h eine sehr geringe Menge PGE<sub>2</sub> ( $4 \pm 0,3 \text{ ng}/24\text{h}$ ). Nach 24 stündiger Stimulation mit Furosemid ( $500 \mu\text{M}$ ) kommt es zu einer signifikant gesteigerten PGE<sub>2</sub>-Bildung ( $20 \pm 5 \text{ ng}/24\text{h}$ ) um den Faktor 5. (Abb. 16).



**Abbildung 16** PGE<sub>2</sub>-Spiegel in ng/24h nach Inkubation mit der Standardlösung plus Furosemid ( $500 \mu\text{M}$ ), (Standard:  $n=6$ , Standard+Furosemid ( $n=6$ ); die PGE<sub>2</sub>-Synthese erhöht sich ca. um den Faktor 5,  $*p \leq 0,05$  im Vergleich zu Standard.

### 3.4.2 Stimulation mit hypotoner Lösung

Die basale PGE<sub>2</sub>-Konzentration beträgt  $3 \pm 0,2 \text{ ng}/24\text{h}$ . Nach 24stündiger Inkubation mit dem hypoosmolaren Medium kommt es zu einer Steigerung der PGE<sub>2</sub>-Synthese um den Faktor 40 auf  $120 \pm 10 \text{ ng}/24\text{h}$  (Abb. 17).

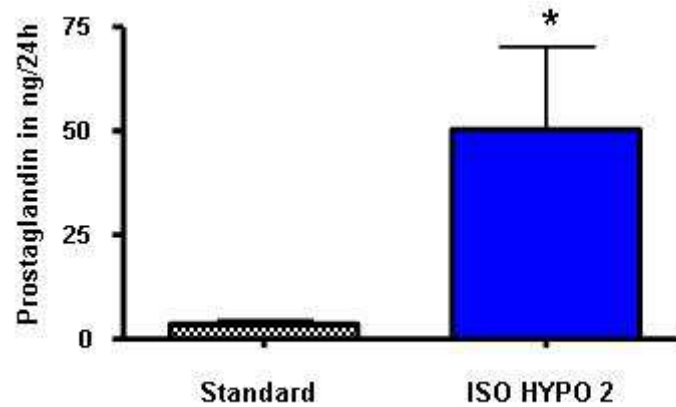


**Abbildung 17** PGE<sub>2</sub>-Spiegel in ng/24h nach Inkubation mit dem Medium HYPO 2, (Standard: n=6, HYPO 2 n=6); die Inkubation der primär kultivierten Schweinenierenzellen in hypotoner Lösung bewirkte eine ausgeprägte Steigerung der Prostaglandinsynthese, Faktor 40, \*p≤0,05 im Vergleich zu Standard.

### 3.4.3 Stimulation mit isotoner hypoosmolarer Lösung

Unter Kontrollbedingungen wird eine basale PGE<sub>2</sub>-Freisetzung von 4±0,5 ng/24h im Überstand kultivierter Schweineepithelzellen gemessen. Nach Inkubation mit isotoner hypoosmolarer Lösung für 24 h kann eine signifikante Steigerung der PGE<sub>2</sub>-Synthese auf 52±15 ng/24h (dies entspricht ca. einem Faktor 14) nachgewiesen werden.

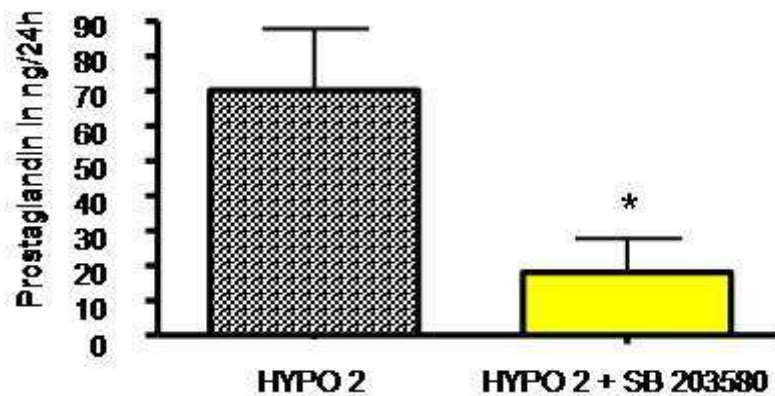




**Abbildung 18** PGE<sub>2</sub>-Spiegel in ng/24h nach Inkubation mit dem Medium ISO HYPO 2. (Standard: n=6, ISO HYPO 2: n=4); die PGE<sub>2</sub>-Synthese erhöht sich um den Faktor 14, \*p≤0,05 im Vergleich zu Standard.

### 3.4.4 Stimulation mit hypotoner Lösung plus MAP-Kinase-Hemmstoff SB 203580

MAP-Kinasen werden diskutiert als upstream gelegene Signalsysteme bei der Induktion der renalen Prostanoidbildung beim aBS [Guan Z, et al., 1998]. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden primär kultivierte TAL-Zellen mit HYPO 2 Medium in Anwesenheit des spezifischen MAPK-Inhibitor SB 203580 (1mg/ml) inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass die HYPO 2 induzierte PGE<sub>2</sub>-Bildung auf bis zu 30% gehemmt wird (70±10ng/24h zu 20±8ng/24h). Dieser Zusammenhang ist in Abb. 19 dargestellt.



**Abbildung 19** PGE<sub>2</sub>-Spiegel in ng/24h nach Inkubation mit dem Medium HYPO 2+SB203580. (Standard: n=6, HYPO 2+SB 203580 n=6). Die Prostaglandinsynthese wird durch Zugabe von SB203580 supprimiert, \*p≤0,05 im Vergleich zu HYPO 2.

### 3.5 RNA-Expression

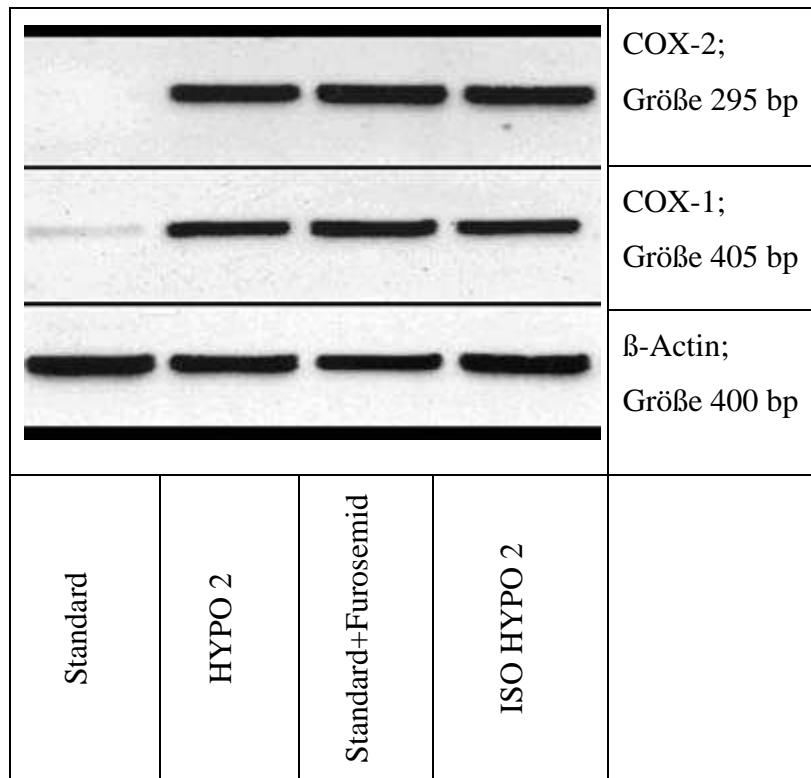
Neben der Messung des Endproduktes PGE<sub>2</sub> sollte als nächstes überprüft werden, ob in den Zellkulturen Induktionsprozesse stattgefunden haben, daher wurde die RNA-Expression der COX-Enzyme und der mPGES-1 an kultivierten TAL-Zellen nach Stimulation mit den unterschiedlichen Lösungen untersucht.

#### 3.5.1 RNA-Expression der COX-1 und COX-2-Isoenzyme nach Stimulation mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen

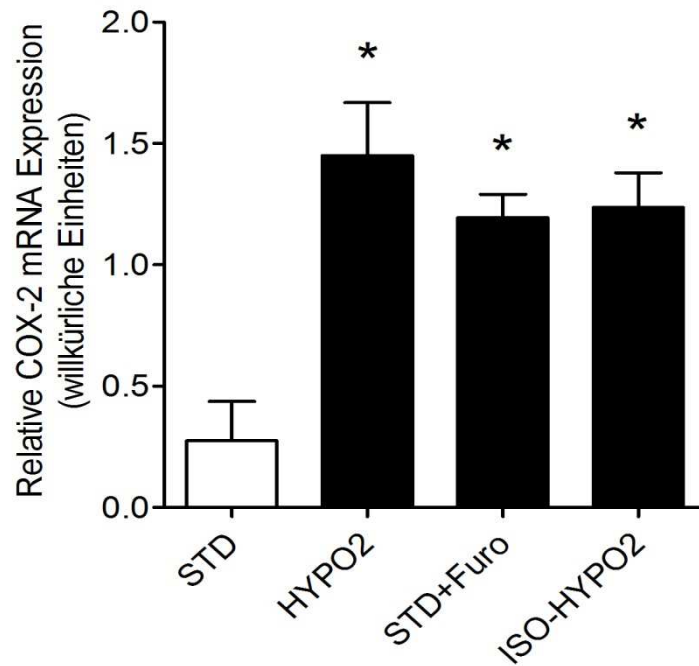
Es wurde der Gehalt an mRNA, bzw. cDNA von β-Actin zunächst mit der von COX-1, COX-2 nach Stimulation mit den unterschiedlichen Medien verglichen. Unter Basalbedingungen war lediglich für die COX-1 mRNA im Agarosegel eine schwache DNA-Bande in der erwarteten Größe von 405 Basenpaaren erkennbar. Das COX-2-Isoenzym war nicht nachzuweisen (Abb. 20).

Wie in Abbildung 20 zu sehen, lässt sich nach Stimulation mit den Medien HYPO 2, Standard+Furosemid und ISO HYPO 2 ein deutlicher Anstieg der mRNA Expression von COX-1 und COX-2 beobachten. Die semiquantitative Analyse der

Bandenexpression zeigt eine signifikante Steigerung der COX-2 Expression um den Faktor 5-6 (Abb. 21).

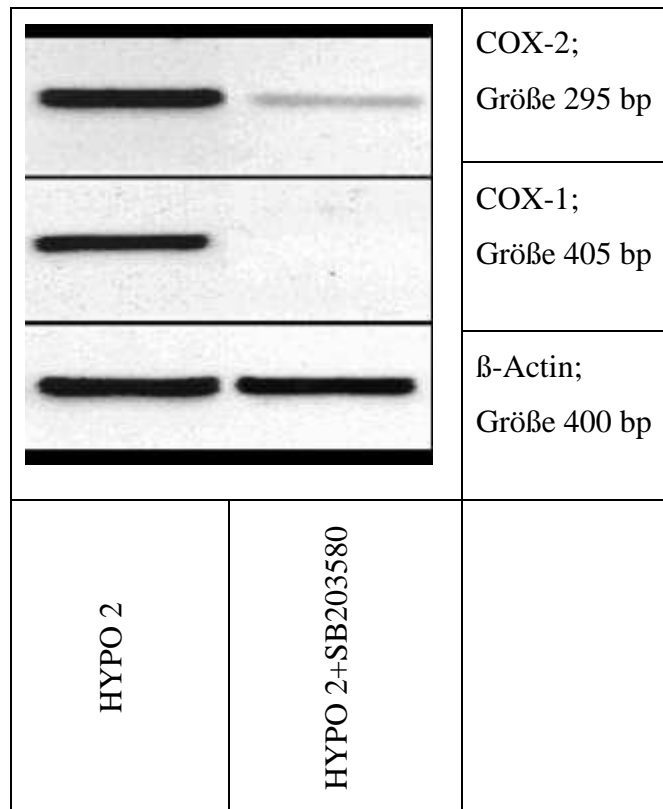


**Abbildung 20** RT-PCR-Analyse der mRNA Expression von COX-1, COX-2 und  $\beta$ -Actin. Nach Stimulation mit den unterschiedlichen Lösungen, erfolgte die Durchführung einer PCR und die Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel. Repräsentative Darstellung aus n=3 Experimenten.

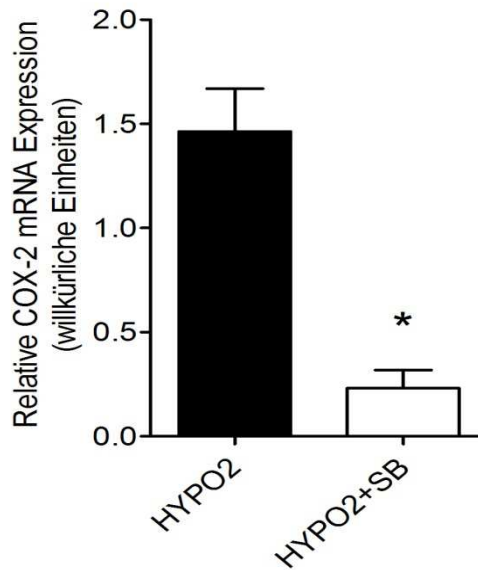


**Abbildung 21** Semiquantitative Analyse der Expression der COX-2 mRNA nach Stimulation mit den Medien HYPO 2, STD (Standard)+Furosemid und ISO HYPO 2. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu Standard;  $n=3$ .

Um der Frage nachzugehen, inwiefern die Induktion der COX-Isoformen durch die p38 MAPK geregelt wird, wurden Stimulationsansätze mit HYPO 2 in Abwesenheit und Gegenwart des MAPKinase-Inhibitors SB203580 durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die gesteigerte COX-2, als auch die COX-1-Expression vollständig supprimierbar waren. Die Expression der Kontrolle,  $\beta$ -Actin, blieb unter diesen experimentellen Bedingungen unverändert (Abb. 22 und Abb. 23).



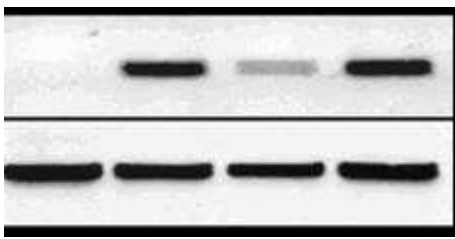
**Abbildung 22** RT-PCR-Analyse der mRNA Expression von COX-1, COX-2 und  $\beta$ -Actin. Nach Stimulation mit dem MAP-Kinase Hemmer SB203580 lässt sich die Expression von COX-1 vollständig und die Expression von COX-2 fast vollständig supprimieren. Repräsentative Darstellung an n=3.



**Abbildung 23** Semiquantitative Analyse der Expression der COX-2 mRNA (SB=SB203580).  
\*  $p < 0,05$  im Vergleich zu Hypo 2;  $n=3$ .

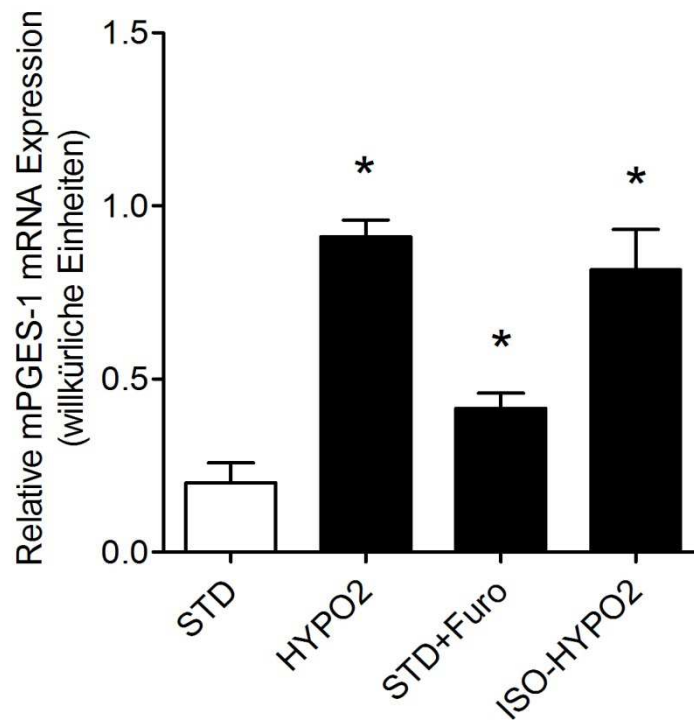
### 3.5.2 RNA-Expression der mPGES-1 nach Stimulation mit unterschiedlichen Salzlösungen

Desweiteren wurde der Gehalt an mRNA von  $\beta$ -Actin mit der mRNA der mPGES-1 verglichen. Unter Basalbedingungen (Standardlösung) war kein positives Signal für die mRNA der mPGES-1 nachzuweisen. Parallel zum nachgewiesenen Anstieg des Endproduktes  $PGE_2$  zeigt sich eine deutliche Expression der PGES-1 nach Stimulation mit dem hypotonen Medium. Nach Stimulation der kultivierten Zellen mit isotonem Medium und mit dem Medium Standard+Furosemid zeigt sich parallel zur gesteigerten  $PGE_2$ -Synthese ebenfalls eine Zunahme der mRNA der mPGES-1 (Ab. 24).

				mPGES-1; Größe 427 bp
				$\beta$ -Actin; Größe 400 bp
Standard	HYPO 2	Standard +Furosemid	ISO HYPO 2	

**Abbildung 24** RT-PCR Analyse der mRNA-Expression von PGES-1. Nach Stimulation der Zellen mit den unterschiedlichen Lösungen erfolgte die Durchführung einer PCR und Auftrennung des PCR-Produktes im Agarosegel. Repräsentative Darstellung an n=3.

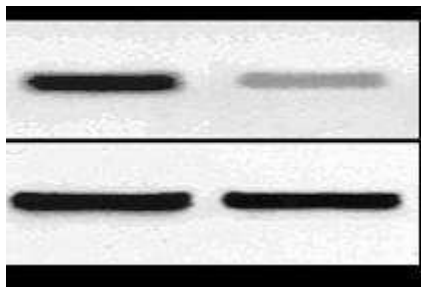
Die semiquantitative Analyse der mPGES-1 mRNA Expression zeigt nach hypotoner Stimulation eine signifikante Steigerung um den Faktor 4-5, wobei unter Stimulation mit Furosemid eine Synthese Zunahme um den Faktor 2 gezeigt werden konnte. Die Stimulation mit isoosmolarer hypotoner Lösung erhöht die mRNA Expression der mPGES-1 um den Faktor 5 (Abb. 25).



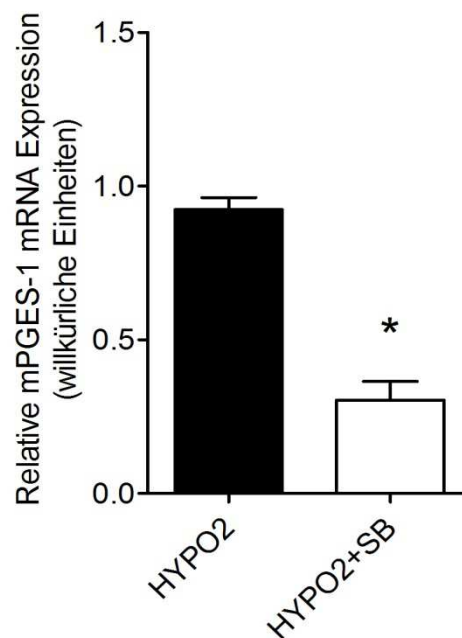
**Abbildung 25** semiquantitative Analyse der Expression der mRNA von mPGES-1 nach Stimulation mit HYPO2, Standard+Furosemid und ISO HYPO 2. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu Standard;  $n=3$ .

Um zu untersuchen, ob auch die Expression der mPGES-1 durch die p38 MAPK geregelt wird, wurden kultivierte m-TAL-Epithelzellen mit hypotonem Medium in Abwesenheit und in Gegenwart von SB203580 inkubiert. Es zeigt sich eine deutliche Suppression der mRNA der mPGES-1 um ca. 75%. Die Expression der Kontrolle,  $\beta$ -Actin, blieb unter diesen experimentellen Bedingungen unverändert (Abb. 26 und 27).



		m-PGES-1; Größe 427 bp
		$\beta$ -Actin; Größe 400 bp
HYPO 2	HYPO 2 + SB203580	

**Abbildung 26** RT-PCR Analyse der mRNA Expression von mPGES-1. Nach Stimulation mit dem MAP Kinase Hemmer SB203580 lässt sich die Expression von PGES-1 supprimieren. Repräsentative Darstellung aus n=3.



**Abbildung 27** Semiquantitative Analyse der mRNA Expression der mPGES-1 nach Stimulation mit HYPO 2 und HYPO 2+SB203580 (SB),\*  $p < 0,05$  im Vergleich zu Hypo 2.

### 3.6 Expression von COX 1 und COX 2 im Western Blot

Unter Basalbedingungen konnte nur das COX 1-Enzym in der Größe von 70 kDa nachgewiesen werden. Unter hypotonen Bedingungen und unter isoosmolaren Bedingungen ebenfalls Nachweis des COX-1 Enzyms, nach Zugabe des MAP-Kinase-Hemmstoffes SB 203580 konnte die COX-1 Expression deutlich supprimiert werden. Im Gegensatz hierzu zeigt sich eine Expression des COX-2 Enzyms nur nach Stimulation mit der hypotonen Lösung und der isoosmolaren Lösung. Inkubation mit einem Schleifendiuretikum (Standardlösung plus Furosemid) führte zu keiner nachweisbaren Expression von COX-2. Parallel zum Verhalten von COX-1 konnte die Expression von COX-2 nach Inkubation mit dem MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 komplett supprimiert werden.

					COX 2, 70 KDa
					COX 1, 70 KDa
Standard	HYPO 2	Standard+Furosemid	HYPO 2 + SB203580	ISO HYPO 2	

**Abbildung 28** Western Blot Analyse der COX-1 und COX-2 Proteinexpression in primär kultivierten TAL-Zellen der Schweinenieren. Nachweis von COX 1 als ubiquitär vorkommende Form der COX-Enzyme nach Stimulation. Expressionszunahme unter hypo- und isoosmolaren Bedingungen. Geringste Expression von COX-1 nach Stimulation mit der Lösung Standard+Furosemid und HYPO2+SB 203580. COX-2-Nachweis nur nach Stimulation mit den Lösungen HYPO 2 und ISO Hypo 2. Repräsentative Darstellung aus n=3 Experimenten.

---

## 4 Diskussion

Das antenatale Bartter Syndrom (aBS) ist eine seltene Erkrankung (Prävalenz:1-9:100.000), welche sich bereits pränatal mit der Ausbildung eines Polyhydramnions und einer daraus resultierenden Frühgeburtlichkeit manifestiert. Postnatal zeigen sich ein exzessiver Wasser- und Elektrolytverlust, sowie Nephrokalzinose, Diarrhoen, Fieber und Gedeihstörungen [Seyberth et al. 1987]. Ein Leitsymptom der Erkrankung ist ein erhöhter PGE<sub>2</sub>-Spiegel im Urin des Patienten mit hieraus resultierenden Komplikationen [Seyberth HW et al., 1987]. Der genaue Pathomechanismus, sowie die molekularbiologischen Hintergründe der gesteigerten Prostaglandinsynthese sind noch nicht endgültig geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwiefern veränderte Elektrolytzusammensetzungen die PGE<sub>2</sub>-Synthese beeinflussen. Ausgangspunkt für die Untersuchungen war ein Zellmodell aus primär kultivierten Schweinenierenzellen.

Die Innenschicht der äußeren Medulla der Niere (TAL), Sitz der relevanten Transportproteine (NKCC2, ROMK), welche beim aBS in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, wurden herauspräpariert. Zur Identifizierung wurden für das TAL-System spezifische Proteine charakterisiert. Mit Hilfe unterschiedlicher Elektrolytmedien sollten die Mechanismen der PGE<sub>2</sub>-Bildung an den Zellen untersucht werden.

Widerstandsmessungen des isolierten Zellmaterials wiesen zunächst auf das Vorhandensein eines relativ schlecht isolierten Epithels hin. In früheren Arbeiten wurden an isolierten Kaninchen m-TAL-Zellen Widerstandswerte um die 300 Ω/cm<sup>2</sup> gemessen [Jans F. et al., 2000]. Durch eine von uns verwendete spezielle Widerstandsmesskammer (im Gegensatz zu den üblicherweise verwendeten Spannungsmessern) gelang es uns, die Hintergrundspannung zu reduzieren (5 Ω/cm<sup>2</sup> vs. 150 Ω/cm<sup>2</sup>). Hierdurch erscheinen die von uns ermittelten Werte von ca. 100 Ω/cm<sup>2</sup> mit den früheren vergleichbar. Unsere Ergebnisse decken sich auch mit ermittelten Messwerten von 20-90 Ω/cm<sup>2</sup> aus vorherigen Arbeiten [Brenner BM, 1996]. Der relativ hohe Widerstand passt zu der Vorstellung, dass insbesondere das mTAL-Epithel ein, durch die Ausbildung von tight junctions, dichtes Epithel darstellt.

Zur weiteren Charakterisierung des TAL wurden die für diesen Tubulusabschnitt charakteristischen Ionenkanäle ROMK und NKCC2 mittels der RT-PCR nachgewiesen.

Das Ergebnis der Widerstandsmessungen und der Nachweis der Ionenkanäle deuten zusammen mit dem morphologischen Erscheinungsbild darauf hin, dass die primär kultivierten Epithelzellen der Schweineniere m-TAL-Zellen darstellen, mit, wenn überhaupt, nur einer geringen Zellkontamination (z. B. durch Fibroblasten).

Mit Hilfe der APAAP-Methode gelang es, die Expression des EP3-Rezeptors in den mTAL-Zellen nachzuweisen. Durch diesen Rezeptor wird aller Wahrscheinlichkeit nach die Wirkung von PGE<sub>2</sub> bezüglich des erhöhten Salz- und Elektrolytverlust vermittelt. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit diesen Rezeptor in den m-TAL-Zellen nachzuweisen. EP1-Rezeptoren fanden sich bisher nur in den Sammelrohren der Niere [Breyer MD, Breyer RM., Jan. 2000]. Auch in unseren Experimenten ließ sich kein positives Signal für den EP1-Rezeptor an isolierten m-TAL-Zellen erkennen. Der Rezeptor EP2 wurde bisher nur in der Media von Arterien und Arteriolen nachgewiesen [Morath R, et al., 1999]. Auch in unseren Experimenten zeigte sich nur eine leichte Anfärbung nach Inkubation mit dem Antikörper für den EP2-Rezeptor, dies spricht allenfalls für eine geringe Expression des Rezeptors in den m-TAL-Zellen. Bereits in älteren Arbeiten wurde eine geringe Expression der mRNA des Rezeptors EP2 nachgewiesen [Jensen BL, et al. 2001], die genaue intrarenale Lokalisation ist allerdings bisher nicht gezeigt worden. Es zeigte sich aber, dass Mäuse, deren EP2-Rezeptoren gezielt ausgeschaltet wurden, einen salzabhängigen Hochdruck entwickeln. Daraus ergibt sich der Schluss, dass auch der EP2-Rezeptor möglicherweise eine Rolle in der Salzausscheidung spielt [Breyer MD, Breyer RM., Jan. 2000]. Weitere Untersuchungen müssen über die genaue Lokalisation dieses Rezeptors in der Niere Aufschluss geben. EP4-Rezeptoren fanden sich bisher in den Glomeruli und der Media der Arterien [Morath R, et al., 1999, Breyer MD, Breyer RM., Jan. 2000]. Es wird vermutet, dass der EP4-Rezeptor an der Regulation der Reninausscheidung und der Abnahme des glomerulären Widerstandes beteiligt ist. Übereinstimmend mit den Ergebnissen früherer Arbeiten zeigte sich in unserem Testmodell ebenfalls kein Hinweis auf die Existenz des Rezeptors EP4 im TAL. Allerdings ließ sich in früheren Arbeiten unter hypertonen Bedingungen eine Zunahme der Expression für die Rezeptoren EP3 und EP4 und die COX-2 aufzeigen [Kim JA et al. 2009].

Die Befunde der Literatur [Yang T. et al, 1999; Yang T. et al, 2000] und meine Untersuchungen zeigen, dass es durch eine Elektrolytverarmung (hypotones Milieu)

über Aktivierung der MAP-Kinase p38 zu einer Induktion der COX-2 und damit zeitgleich zu einer Zunahme der mPGES1-Expression kommt. Möglicherweise steigt hierdurch die Synthese der Prostaglandine an, welche die für das Bartter-Syndrom typischen Symptome hervorrufen. Durch Bindung der Prostaglandine an den EP3-Rezeptor wird die Funktion der Adenylatcyclase reduziert, durch den hieraus reduzierten Abbau von ATP zu cAMP kommt es zu einer fehlenden Reabsorption von Chlorid, Natrium, Magnesium und Calcium. In der Macula Densa wird die Salzionenkonzentration gemessen und es kann per Feedbackmechanismus das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert werden. Durch das freigesetzte Angiotensin kommt es zu einer Vasokonstriktion und einer hieraus resultierenden Hypertonie. Durch den erhöhten Aldosteronspiegel wird der Rücktransport von Natrium und Wasser aus dem Urin ins Blut gefördert, wodurch der NaCl-Gehalt des Blutes und das Blutvolumen steigt. Insgesamt kommt es durch das aktivierte RAAS zu einem erhöhten Kochsalz- und Wassergehalt des Körpers. Um den Zusammenhang zwischen Hypoosmolarität und gesteigerter Prostaglandinsynthese zu untersuchen, verwendeten wir Lösungen, die sich in Salzgehalt und Osmolarität unterschieden. Zur Herstellung der Isoosmolarität wurde Mannitol verwendet, welches standardmäßig für Osmolaritätseinstellungen verwendet wird [Cheng et al. 2000]. Es ist als inerte Zucker gut geeignet, da es kaum metabolisiert wird. Nach Stimulation mit osmotisch ausgeglichenen Bedingungen, allerdings mit verminderter Salzkonzentration, zeigte sich immer noch ein deutlicher Anstieg der PGE<sub>2</sub>-Synthese (Faktor 14). Hierdurch wird der Einfluss von NaCl auf die Prostaglandinsynthese deutlich.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde mit Hilfe von Furosemid der NKCC2-Kanal blockiert, hierdurch kommt es in den Zellen zu einem hypoosmolaren Milieu und daher zu den gleichen Ausgangsbedingungen wie in den o. g. Experimenten. Auch hier gelang es uns den Anstieg der Prostaglandinsynthese nachzuweisen.

Unsere Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Yang et al. [Yang et al. 2000]. Die Arbeitsgruppe konnte eine salzabhängige Stimulation der PGE<sub>2</sub>-Synthese zeigen. Nach Stimulation von MMDD1-Zellen, einer Macula densa-Zelllinie der Maus, mit einer niedrigen NaCl-Konzentration (60 mM), zeigte sich eine zeitabhängige Stimulation der PGE<sub>2</sub>-Synthese, welche durch den COX-2-spezifischen Inhibitor NS-398 unterdrückt werden konnte. Nach Reduktion der NaCl-Dosis von 60 auf 6 mM bei allerdings

isoosmotischen Bedingungen, zeigte sich eine vermehrte COX-2-Expression [Yang et al. 2000].

Die für die Umwandlung von Prostaglandin  $H_2$  in  $PGE_2$  verantwortlichen Prostaglandin-E-Synthasen (PGES) existieren in unterschiedlichen Formen [Murakami M. et al, 2002]. Die zytosolische  $PGE_2$ -Synthase (cPGES) kommt ubiquitär vor, ist funktionell meist mit COX-1 gekoppelt und im Zytosol lokalisiert. Als weitere Formen existieren die mikrosomalen PGES, mPGES-1 und mPGES-2. Die mPGES-1 ist meist mit COX-2 gekoppelt und in erster Linie für die induzierte  $PGE_2$ -Synthese verantwortlich [Thoren, S. et al, 2000; Jacobson, P. J., et al, 1999; Thoren, S., et al 2003]. mPGES-1 wird wie COX-2 durch proinflammatorische Mediatoren reguliert und stellt deshalb ein potentielles Zielmolekül für die pharmakologische Therapie dar. Die zuletzt entdeckte PGE-Synthase ist die mikrosomale PGE Synthase-2 (mPGES-2). mPGES-2 ist konstitutiv exprimiert und funktionell mit beiden COX-Isoformen gekoppelt. Die physiologische Bedeutung der mPGES-2 ist nicht bekannt.

In unseren Experimenten wurde das Verhalten der mPGES-1 untersucht, da diese für die induzierte  $PGE_2$ -Synthese in der Niere verantwortlich sein soll und mit COX-2 gekoppelt ist [Francois H., 2007; Kömhoff M., 2004]. Parallel zu der aufgezeigten Zunahme der  $PGE_2$ -Konzentration konnten wir unter hypoosmolaren Bedingungen eine deutliche Zunahme der Expression der mPGES-1 zeigen.

Als Schlüsselenzym für die  $PGE_2$ -Synthese gelten die beiden Cyclooxygenasen, COX-1 und COX-2. Parallel zum Verhalten der Prostaglandine und der mPGES-1 zeigte sich unter hypoosmolaren und isoosmolaren Bedingungen eine deutliche Zunahme der Expression der m-RNA von COX-1 und COX-2. Die Expression der m-RNA von COX-2 steigt auch nach Stimulation mit der Lösung Standard+Furosemid, die ja auch in einem hypoosmolaren Milieu mündet. Auf Proteinebene läßt sich allerdings nur nach Stimulation mit hypo- und isoosmolarer Lösung ein Anstieg der Expression von COX-2 aufzeigen, eine Expression von COX-2 nach Stimulation mit der Lösung Standard+Furosemid bleibt aus. Zusätzlich läßt sich eine Zunahme der Expression von COX-1 unter hypo- und isoosmolaren Bedingungen auf Proteinebene nachweisen. Insgesamt konnte eine Zunahme der Expression von COX-1 und COX-2 gezeigt werden, in früheren Arbeiten ist bisher nur eine Zunahme der induzierbaren COX-2 aufgezeigt worden [Yang et al., 2000; Cheng et al. 2000]. Verantwortlich für die

Induktion der mPGES-1 und der COX werden in der Literatur MAP-Kinasen beschrieben [Woo JG, 2011; Joos H, 2010]. Es handelt sich hierbei um Proteinkinasen mit einer Molekülmasse um 36.000-44.000 Da., welche ihre Substrate an spezifischen Serin- und Threonin-Resten phosphorylieren.

Die Arbeitsgruppe um Yang konnte in ihrer Arbeit an MMDD1-Zellen beobachten, dass die salzabhängige Zunahme der PGE<sub>2</sub>-Synthese bzw. COX-2 Expression durch den MAP Kinase Inhibitor SB 203580 inhibiert wird. Hieraus folgerte die Arbeitsgruppe von Yang et al., dass eine erniedrigte Salzkonzentration über eine Aktivierung der MAP-Kinase eine Stimulation von COX-2 und PGE<sub>2</sub> hervorruft [Yang T., 2000].

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe decken sich mit unseren Ergebnissen. Auch bei primär kultivierten Schweinenierenzellen konnte der unter salzreduzierten Bedingungen induzierte Anstieg der COX und der Prostaglandine durch Zugabe des MAP-Kinase Inhibitors SB 203580 supprimiert werden.

Diese Ergebnisse stehen auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Cheng et al [Cheng et al. 2000]. Diese Autoren untersuchten an primär kultivierten mTAL-Zellen des Kaninchens die Signalwege, über die die COX-2-Synthese gesteuert wird. Auch hier zeigte sich nach Inkubation mit einer niedrigen Salzkonzentration ein signifikanter Anstieg der COX-2 Expression. Die selektive Inkubation mit Natrium führte zu einer Zunahme der COX-2 Expression, wohingegen die selektive Inkubation mit Chlorid keinen Effekt zeigte. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich bei der Steigerung der COX-2-Synthese um eine natriumabhängige Reaktion handelt. Nach Zugabe von Inhibitoren für Proteinkinase A bzw. Adenylatcyclase zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die COX-2-Expression. Im Gegensatz dazu blockierte der MAP-Kinase Inhibitor signifikant die angestiegene COX-2-Expression. Dieser Effekt ließ sich auch in vivo beobachten. In Ratten, die für 14 Tage einer salzarmen Diät ausgesetzt worden waren, zeigte sich im renalen Kortex ein signifikanter Anstieg der immunoreaktiven p38 Expression. In der Kontrollgruppe ergab sich hingegen kein Unterschied [Cheng et al. 2000].

Fasst man die Beobachtungen von Cheng et al. [Cheng et al. 2000] und unsere Befunde zusammen, ergeben sich eindeutige Hinweise darauf, dass die durch eine erniedrigte Salzkonzentration, bzw. wahrscheinlich erniedrigte Natriumkonzentration, gesteigerte

Synthese von PGE<sub>2</sub> und COX-2 über die Aktivierung der MAP-Kinase p38 vermittelt wird. Die genauen Mechanismen, über welche eine erniedrigte Salzkonzentration die MAP-Kinase aktiviert, sind bis jetzt noch ungeklärt. MAP Kinasen werden über sequentielle Phosphorylierung von Tyrosin und Threonin von MAP-Kinaseaktivatoren aktiviert. Normalerweise wird p38 durch UV-Licht, Röntgenstrahlen, freie Radikale und Hitze, aber auch durch Zytokine z. B. Tumornekrosefaktor und IL-1 $\beta$  aktiviert [Ichijo et al. 1999].

Um genauere Erkenntnisse über die Aktivierung der MAP Kinase und der daraus resultierenden gesteigerten Prostaglandinsynthese zu erhalten, sind in Zukunft weitere Untersuchungen auf dem Boden dieser Arbeit notwendig.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass der Versuchsaufbau gut geeignet ist die aufgeworfenen Fragestellungen zu untersuchen. Hypoosmolarität führt zu einer gesteigerten PGE<sub>2</sub>-Synthese und somit zu einem Leitsymptom des antenatalen Bartter-Syndroms.



## 5 Zusammenfassung

Leitsymptome des Hyperprostaglandinsyndroms sind neben einer erhöhten renalen Salz- und Wasserausscheidung eine verstärkte Reninproduktion, eine Hyperkalzurie und eine Hypertrophie des juxtaglomerulären Apparates. Bereits pränatal kommt es zur Ausbildung einer fetalen Polyurie, welche zur Ausbildung eines Polyhydramnions führen kann. Hierin ist die extrem gesteigerte Frühgeburtlichkeitsrate zwischen der 28. und 34. SSW begründet. Für die klinischen Symptome Durst, Fieber und Wachstumsbeeinträchtigungen wird v. a. eine massiv erhöhte renale Ausscheidung von PGE<sub>2</sub> verantwortlich gemacht.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von primär kultivierten Schweinenierenzellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife, die Regulation der Prostaglandinsynthese näher untersucht und der Einfluss von Elektrolyten überprüft. Nach Stimulation mit hypotoner Lösung wurde eine Zunahme der PGE<sub>2</sub>-Synthese, der Expression der mPGES-1 mRNA und der COX-1 und COX-2 mRNA sowie eine Zunahme des Proteins der COX-2 beobachtet. Welche Art der Elektrolytveränderung hierfür ausschlaggebend ist, v. a. ob der Chloridentzug der maßgebliche Faktor ist, muss in Experimenten weiter geklärt werden.

Unter isoosmolaren Bedingungen zeigte sich ebenfalls eine Expression der PGES-1, allerdings weniger deutlich als nach Stimulation mit hypoosmolarem Medium. Somit lässt sich durchaus eine Beteiligung der PGES-1 an der PGE<sub>2</sub>-Bildung bei Veränderung des zellulären Salzhaushaltes vermuten.

Meine Ergebnisse geben darüber hinaus Anlass anzunehmen, dass die gesteigerte Prostaglandinsynthese MAP Kinase-gesteuert ist. Zur genaueren Aufklärung der beteiligten Faktoren und Wirkmechanismen müssen weitere Experimente erfolgen.

Die klinische Relevanz weiterer Untersuchungen wird deutlich, wenn man bedenkt, dass der einzige therapeutische Ansatz der Salzverlusttubulopathien momentan die Hemmung der Prostaglandinsynthese darstellt. Es fehlen auch grundlegende Erkenntnisse über das COX-1/COX-2 Gleichgewicht im menschlichen Körper, welche für die Entwicklung weiterer Therapien notwendig sind. Mit dem Zellmodell konnten erste Regulationsmechanismen aufgedeckt werden, es eignet sich aber sicherlich auch dazu weitere Abläufe dieses Zellsystems näher zu untersuchen.

---

## 6 Literaturverzeichnis

**Attmane-Elakeb A, Mount DB, Sibella V, Vernimmen C, Hebert SC, Bichara M.,** Stimulation by in vivo and in vitro metabolic acidosis of expression of rBSC-1, the Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)-2Cl<sup>-</sup> cotransporter of the rat medullary thick ascending limb. *J Biol Chem.* 1998; 273(50):33681-91.

**Bachmann S, Koeppen-Hagemann I, Kriz W.,** Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) in rat kidney as revealed by protein A-gold immunocytochemistry. *Histochemistry.* 1985; 83(6):531-8.

**Bachmann S, Metzger R, Bunnemann B.,** Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney. *Histochemistry.* 1990; 94(5):517-23.

**Badzyska B, Sadowski J.,** Opposed effects of prostaglandin E<sub>2</sub> on perfusion of rat renal cortex and medulla: interactions with the renin-angiotensin system. *Exp Physiol.* 2008; 93(12): 1292-302.

**Baer PC, Tunn UW, Nunez G, Scherberich JE, Geiger H.,** Transdifferentiation of distal but not proximal tubular epithelial cells from human kidney in culture. *Exp Nephrol.* 1999; 7(4):306-13.

**Bartter FC.,** Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. *Am J Med.* 1962; 33:811-28.

**Bartter FC.,** Prostaglandins are overproduced by the kidneys and mediate hyperreninemia in Bartter's syndrome. *Trans Assoc Am Physicians* 1976;89:77-91.

**Brenner BM.,** Renal transport of Glucose, Amino Acids, Sodium, Chloride, and Water. *The Kidney, Chapter 9, 5th ed, Philadelphia, W.B. Saunders company, 1996.*

**Bleich M, Schlatter E, Greger R.,** The luminal K<sup>+</sup> channel of the thick ascending limb of Henle's loop. *Pflugers Arch.* 1990; 415(4):449-60.

**Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, Yang Y, Brenner BM, Hebert SC.,** ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am J Physiol.* 1995; 268(6 Pt 2):F1132-40.

**Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanas A, Konstam MA, Baron JA.,** Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx (APPROVe) Trial Investigators. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med.* 2005; 352(11):1092-102.

**Breyer MD.,** Prostaglandin receptors in the kidney: a new route for intervention? *Exp Nephrol.* 1998; 6(3):180-8.

**Breyer MD.,** Regulation of renal function by prostaglandin E receptors. *Kidney Int Suppl.* 1998; 67:S 88-94.

---

**Breyer MD, Breyer RM.,** Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 279(1):F12-23.

**Breyer MD, Harris RC.,** Cyclooxygenase-2 and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 10: 89-98, 2001.

**Breyer MD, Breyer RM.,** Prostaglandin receptors: their role in regulating renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2000; 9(1):23-9, Review.

**Chandrasekharan S.,** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(21):13926-31.

**Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC.,** Role of p38 in the regulation of renal cortical cyclooxygenase-2 expression by extracellular chloride. *J.Clin.Invest.* 2000, 106: 681-688.

**Cheng HF, Harris RC.,** Cyclooxygenase-2 Expression in Cultured Cortical Thick Ascending Limb of Henle Increases in Response to Decreased Extracellular Ionic Content by Both Transcriptional and Post-transcriptional Mechanisms. *JBC.* 47(277): 45638-45643, 2002.

**Coleman DA.,** Effects of 21-day treatment with melengestrol acetate (MGA) with or without subsequent prostaglandin F2 alpha on synchronization of estrus and fertility in beef cattle. *J Anim Sci.* 1990; 68(10):3300-5.

**Culpepper RM.,** PGE2, forskolin, and cholera toxin interactions in modulating NaCl transport in mouse mTALH. *Am J Physiol.* 1984; 247(5 Pt 2):F784-92.

**DeMaria AN, Weir MR.,** Coxibs-beyond the GI tract: renal and cardiovascular issues. *J Pain Symptom Manage.* 2003; 25(2 Suppl):S41-9.

**Derst C, Wischmeyer E, Preisig-Müller R, Spauschus A, Konrad M, Hensen P, Jeck N, Seyberth HW, Daut J, Karschin A.,** A hyperprostaglandin E syndrome mutation in Kir1.1 (renal outer medullary potassium) channels reveals a crucial residue for channel function in Kir1.3 channels. *J Biol Chem.* 1998 11;273(37):23884-91.

**Doi T.,** Extracellular K<sup>+</sup> and intracellular pH allosterically regulate renal Kir1.1 channels. *J Biol Chem.* 1996; 271(29):17261-6.

**Escalante BA, Ferreri NR.,** Cytokines affect ion transport in primary cultured thick ascending limb of Henle's loop cells. *Am J Physiol.* 1994; 266(6 Pt 1):C1568-76.

**Escalante B, Erlj D.,** Ion transport inhibition in the medullary thick ascending limb of Henle's loop by cytochrome P450-arachidonic acid metabolites. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1991;21A:209-12.

**Fanconi A.,** Chronic hypokalaemia with growth retardation, normotensive hyperrenin-hyperaldosteronism ("Bartter's syndrome"), and hypercalciuria. Report of two cases with emphasis on natural history and on catch-up growth during treatment. *Helv Paediatr Acta.* 1971; 144-163.

---

**Francois H, Facemire C, Kumar A, Audoly L, Koller B, Coffman T.,** Role of microsomal prostaglandin E synthase 1 in the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(5):1466-75.

**Friis UG, Stubbe J, Uhrenholt TR, Svenningsen P, Nüsing RM, Skøtt O, Jensen BL.,** Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 ; 289(5):F989-97.

**Frindt, G.,** Low-conductance K channels in apical membrane of rat cortical collecting tubule. *Am J Physiology.* 1989; 256(1 Pt 2):F143-51.

**Gerber JG, Keller RT, and Nies AS.,** Prostaglandins and renin release: the effect of PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, and 13,14-dihydro PGE<sub>2</sub> on the baroreceptor mechanism of renin release in the dog. *Circ Res* 44: 796-799, 1979.

**Giebisch, G.,** pH-dependent modulation of the cloned renal K<sup>+</sup> channel, ROMK. *Am J Physiology* 1998; 275(6 Pt 2):F972-81.

**Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG.,** A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians.* 1966, 79: 221-223.

**Good DW, Cafilisch CR, George T.,** Prostaglandin E2 regulation of ion transport is absent in medullary thick ascending limbs from SHR. *Am J Physiol.* 1995; 269(1 Pt 2):F47-54.

**Grotjohann I, Gitter AH, Köckerling A, Bertog M, Schulzke JD, Fromm M.,** Localization of cAMP- and aldosterone-induced K<sup>+</sup> secretion in rat distal colon by conductance scanning. *J Physiol.* 1998; 507 ( Pt 2):561-70.

**Guan Z, Buckman SY, Pentland AP, Templeton DJ, Morrison AR.,** Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* 1998 May 22;273(21):12901-8.

**Guggino SE, Guggino WB, Green N, Sacktor B.,** Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cultured medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol.* 1987; 252(2 Pt 1):C121-7.

**Haas M, Forbush B 3rd.,** The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu Rev. Physiol.* 2000; 62:515-34.

**Hebert SC.,** Bartter syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 12: 527-532, 2003.

**Howard MJ, Insel PA.,** Elevated extracellular K<sup>+</sup> enhances arachidonic acid release in MDCK-D1 cells. *Am J Physiol.* 1990; 259(2 Pt 1):C224-31.

**Ichijo H.,** From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene.* 1999; 18(45):6087-93.

**Jakobsson P. J, Thoren S, Morgenstern R. & Samuelsson B.,** Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible

---

enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:7220-5.

**Jans F, Vandenabeele F, Helbert M, Lambrichts I, Ameloot M, Steels P.,** A simple method for obtaining functionally and morphologically intact primary cultures of the medullary thick ascending limb of Henle's loop (MTAL) from rabbit kidneys. *Pflugers Arch.* 2000; 440(4):643-51.

**Jeck N, Reinalter SC, Henne T, Marq W, Mallmann R, Pasel K, Vollmer M, Klaus G, Leonhardt A, Seyberth HW, Konrad M.,** Hypokalemic salt-losing tubulopathy with chronic renal failure and sensorineural deafness. *Pediatrics.* 2001; 108(1):E5.

**Jensen BL, Schmid C, Kurtz A.,** Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 271: F659-669, 1996.

**Jensen BL, Stubbe J, Hansen PB, Andreassen D, Skøtt O.,** Localization of prostaglandin E(2) EP2 and EP4 receptors in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001 Jun;280(6):F1001-9.

**Joos H, Albrecht W, Laufer S, Brenner RE.,** Differential effects of p38MAP kinase inhibitors on the expression of inflammation-associated genes in primary, interleukin-1beta-stimulated human chondrocytes. *Br J Pharmacol.* 2010;160(5):1252-62.

**Kaji et al.** Prostaglandin E2 inhibits Na-K-2Cl cotransport in medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol.* 1996; 271(1 Pt 1):C354-61.

**Kammerl MC, Nüsing RM, Seyberth HW, Riegger GA, Kurtz A, Krämer BK.,** Inhibition of cyclooxygenase-2 attenuates urinary prostanoid excretion without affecting renal renin expression. *Pflugers Arch.* 2001; 442(6):842-7.

**Kim HJ, Cui XS, Kim EJ, Kim WJ, Kim NH.,** New porcine microRNA genes found by homology search. *Genom* 2006; 49(10):1283-6.

**Kim JA, Sheen MR, Lee SD, Jung JY, Kwon HM.,** Hypertonicity stimulates PGE2 signaling in the renal medulla by promoting EP3 and EP4 receptor expression. *Kidney Int.* 2009;75(3):278-84.

**Kiriyama M, Ushikubi F, Kobayashi T, Hirata M, Sugimoto Y, Narumiya S.,** Ligand binding specificities of the eight types and subtypes of the mouse prostanoid receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol.* 1997; 122(2):217-24.

**Kömhoff M, Jeck NDM, Seyberth HW, Gröne HJ, Nüsing RM, Breyer MD.,** Cyclooxygenase-2 expression is associated with the renal macula densa of patients with Bartter-like syndrome. *Kidney Int.* 58: 2420-2425, 2000.

**Kömhoff M, Reinalter SC, Gröne HJ, Seyberth HW.,** Induction of microsomal prostaglandin E2 synthase in the macula densa in children with hypokalemic salt-losing tubulopathies. *Pediatr Res.* 2004;55(2):261-6.

---

**Konrad M, Leonhardt A, Hensen P, Seyberth HW, Köckerling A.** Prenatal and postnatal management of hyperprostaglandin E syndrome after genetic diagnosis from amniocytes. *Pediatrics*. 1999; 103(3):678-83.

**Lawrence RA, Jones RL, Wilson LH.** Characterization of receptors involved in the direct and indirect actions of prostaglandins E and I on the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol*. 1992; 105(2):271-8.

**Ling BN, Kokko KE, Eaton DC.** Prostaglandin E2 activates clusters of apical Cl<sup>-</sup> channels in principal cells via a cyclic adenosine monophosphate-dependent pathway. *J Clin Invest*. 1994; 93(2):829-37.

**Long CR, Kinoshita Y, Knox FG.** Prostaglandin E2 induced changes in renal blood flow, renal interstitial hydrostatic pressure and sodium excretion in the rat. *Prostaglandins*. 1990; 40(6):591-601.

**Lundgren DW, Moore RM, Collins PL, Moore JJ.** Hypotonic stress increases cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release from amnion-derived WISH cells. *J Biol Chem*. 1997; 272(32):20118-24.

**Lytle C, Xu JC, Biemesderfer D, Forbush B 3rd.** Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. *Am J Physiol*. 1995; 269(6 Pt 1):C1496-505.

**Macica CM, Yang Y, Herbert SC, Wang WH.** Arachidonic acid inhibits activity of cloned renal K<sup>+</sup> channel, ROMK1. *Am J Physiol*. 1996; 271(3 Pt 2):F588-94.

**Marlow N, Chiswick ML.** Neonatal Bartter's syndrome, indomethacin and necrotising enterocolitis. *Acta Paediatr Scand*. 1982; 71(6):1031-2.

**McKenzie JK, McQueen EG.** Immunofluorescent localization of Tamm-Horsfall mucoprotein in human kidney. *J Clin Pathol*. 1969; 22(3):334-9.

**Mc Nicholas CM, Yang Y, Giebisch G, Herbert SC.** Molecular site for nucleotide binding on an ATP-sensitive renal K<sup>+</sup> channel (ROMK2). *Am Journal Physiology* 1996; 271(2 Pt 2):F275-85.

**Morath R, Klein T, Seyberth HW, Nüsing RM.** Immunolocalization of the four prostaglandin E2 receptor proteins EP1, EP2, EP3, and EP4 in human kidney. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10(9):1851-60.

**Mount DB, Baekgaard A, Hall AE, Plata C, Xu J, Beier DR, Gamba G, Hebert SC.** Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL I. Molecular characterization and intrarenal localization. *Am J Physiol*. 1999; 276(3 Pt 2):F347-58.

**Murakami M, Nakatani Y, Tanioka T, Kudo I.** Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002; 68-69:383-99.

**Naesens M, Steels P, Verberckmoes R, Vanrenterghem Y, Kuypers D.** Bartter's and Gitelman's syndromes: from gene to clinic. *Nephron Physiol*. 2004;96(3):p65-78.

---

**Nantel N, Meadows E, Denis D, Connolly B, Metters K, Giaid A.**, Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly. *FEBS Lett.* 457: 475-477, 1999.

**Nüsing RM, Reinalter SC, Peters M, Kömhoff M, Seyberth HW.**, Pathogenetic role of cyclooxygenase-2 in hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome: therapeutic use of the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 70(4):384-90.

**Obermuller M, Kunchaparty S, Ellison DH, Bachmann S.**, Expression of the Na-K-2 Cl cotransporter by macula densa and thick ascending limb cells of rat and rabbit nephron. *J Clin Invest.* 1996; 98(3):635-40.

**Ohlsson A, Sieck U, Cumming W, Akhtar M, Serenius F.**, A variant of Bartter's syndrome. Bartter's syndrome associated with hydramnios, prematurity, hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Acta Paediatr Scand.* 1984; 73(6):868-74.

**Okuda T, Kojima I, Ogata E, Kurokawa K.**, Ambient Cl<sup>-</sup> ions modify rat mesangial cell contraction by modulating cell inositol trisphosphate and Ca<sup>2+</sup> via enhanced prostaglandin E<sub>2</sub>. *J Clin Invest.* 1989; 84(6):1866-72.

**Payne JA, Xu JC, Haas M, Lytle CY, Ward D, Forbush B 3rd.**, Primary structure, functional expression, and chromosomal localization of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter in human colon. *J Biol Chem.* 1995; 270(30):17977-85.

**Peco-Antic A, Dudic S, Marsenic O, Zivic G.**, Bartter's syndrome: new classification, old therapy. *Srp Arh Celok Lek.* 2001; 129(5-6):139-42.

**Persson AE, Ollerstam A, Liu R, Brown R.**, Mechanisms for macula densa cell release of renin. *Acta Physiol Scand.* 2004, 181(4): 471-474.

**Persson AE, Salomonsson M, Westerlund P, Greger R, Schlatter E, Gonzalez E.**, Macula densa function. *Kidney Int.* 32: 39-44, 1991.

**Peskar BA.**, Derivate des Arachidonsäurestoffwechsels. *Allg. und spez. Pharmakologie und Toxikologie*, Forth/Henschler/Rumml (eds), Urban-Fischer-Verlag, Aufl.8: 381-392, 2001.

**Peters M, Jeck N, Seyberth HE, Konrad M.**, Hereditary hypokalemic salt-losing tubulopathies: Bartter-like syndromes. *Contrib Nephrol.* 2001; (136):157-73.

**Piper P, Vane J.**, The release of prostaglandins from lung and other tissues. *Ann N Y Acad Sci.* 1971; 180:363-85.

**Proesmans W, Devlieger H, Van Assche A, Eggermont E, Vandenberghe K, Lemmens F, Sieprath P, Lijnen P.**, Bartter syndrome in two siblings--antenatal and neonatal observations. *Int J Pediatr Nephrol.* 1985; 6(1):63-70.

---

**Reinalter SC, Jeck N, Brochhausen C, Watzer B, Nüsing RM, Seyberth HW, Kömhoff M.** Role of cyclooxygenase-2 in hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome. *Kidney Int.* 2002; 62(1):253-60.

**Reinalter SC, Jeck N, Peters M, Seyberth HW.** Pharmacotyping of hypokalaemic salt-losing tubular disorders. *Acta Physiol Scand.* 2004;181(4):513-21.

**Rosenbaum P, Hughes M.** Persistent, probably congenital, hypokalemic metabolic alkalosis with hyaline degeneration of renal tubules and normal urinary aldosteron. *Am J Dis Child* 94:560, 1957.

**Russel JM.** Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev.* 2000; 80(1):211-76.

**Schlatter E, Fröbe U, Greger R.** Ion conductances of isolated cortical collecting duct cells. *Pflugers Arch.* 1992; 421(4):381-7.

**Schröter J, Timmermanns G, Seyberth HW, greven J, Bachmann S.** Marked reduction of Tamm-Horsfall protein synthesis in hyperprostaglandin E-syndrome. *Kidney Int.* 1993; 44(2):401-10.

**Seyberth HW, Rascher W, Schweer H, Kühl PG, Mehl O, Scherer K.** Congenital hypokalemia with hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome. *J Pediatr.* 1985, 107: 694-701.

**Seyberth HW, Königer SJ, Rascher W, Kühl PG, Schweer H.** Role of prostaglandins in hyperprostaglandin E syndrome and in selected renal tubular disorders. *Pediatr Nephrol.* 1987;1(3):491-7.

**Seyberth HW.** How can you differentiate neonatal Bartter's syndrome from hyperprostaglandin (-uria) E2 syndrome? *Pediatr Nephrol.* 1994; 8(4):407.

**Seyberth HW.** An improved terminology and classification of Bartter-like syndromes. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2008;4(10):560-7.

**Shankar SS, Brater DC.** Loop diuretics: from the Na-K-2Cl transporter to clinical use. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 284(1):F11-21.

**Shoemaker L, Welch TR, Bergstrom W, Abrams SA, Yergey AL, Vieira N.** Calcium kinetics in the hyperprostaglandin E syndrome. *Pediatr Res.* 1993; 33(1):92-6.

**Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP.** Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet.* 1996; 13(2):183-8.

**Stokes JB, Kokko JP.** Inhibition of sodium transport by prostaglandin E2 across the isolated, perfused rabbit collecting tubule. *J Clin Invest.* 1977 Jun; 59(6):1099-104.

**Stokes JB.** Effect of prostaglandin E2 on chloride transport across the rabbit thick ascending limb of Henle. Selective inhibitions of the medullary portion. *J Clin Invest.* 1979; 64(2):495-502.



---

**Thoren S, Weinander R, Saha S, Jegerschold C, Pettersson PL, Samuelsson B, Hebert H, Hamberg M, Morgenstern R, Jakobsson P. J.,** Human microsomal prostaglandin E synthase-1: purification, functional characterization, and projection structure determination. *J Biol Chem* 2003 278, 22199-209.

**Thoren S, Jakobsson P. J.,** Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *Eur J Biochem* 2000; 267, 6428-34.

**Trelle S, Reichenbach S, Wandel S, Hildebrand P.,** Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ* 2011; 342:c7086 doi: 10.1136/bmj.c7086.

**Uchida S.,** Physiological role of CLC-K1 chloride channel in the kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15 Suppl 6:14-5.

**Valentich JD, Stokols MF.,** An established cell line from mouse kidney medullary thick ascending limb. I. Cell culture techniques, morphology, and antigenic expression. *Am J Physiol.* 1986; 251(2 Pt 1):C299-311.

**Valentich JD, Stokols MF.,** An established cell line from mouse kidney medullary thick ascending limb. II. Transepithelial electrophysiology. *Am J Physiol.* 1986; 251(2 Pt 1):C312-22.

**Vane JR.,** Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* 1971 23;231(25):232-5.

**Vane JR, Bakhle YS, Botting RM.,** Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998, 38: 97-120.

**Waldegger S, Jeck N, Barth P, Peters M, Vitzthum H, Wolf K, Kurtz A, Konrad M, Seyberth HW.,** Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels. *Pflugers Arch.* 2002; 444(3):411-8.

**Wang WH, Schwab A, Giebisch G.,** Regulation of small-conductance K<sup>+</sup> channel in apical membrane of rat cortical collecting tubule. *Am J Physiol.* 1990; 259(3 Pt 2):F494-502.

**Wang WH, Giebisch G.,** Dual modulation of renal ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by protein kinases A and C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 1;88(21):9722-5.

**Watts BA 3rd, Di Mari JF, Davis RJ, Good DW.,** Hypertonicity activates MAP kinases and inhibits HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption via distinct pathways in thick ascending limb. *Am J Physiol.* 1998; 275(4 Pt 2):F478-86.

**Woo JG, Park SY, Lim JC, Joo MJ, Kim HR, Sohn UD.,** Acid-induced COX-2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> production via activation of ERK1/2 and p38 MAPK in cultured feline esophageal smooth muscle cells. *Arch Pharm Res.* 2011;34(12):2131-40.

**Xu JZ, Hall AE, Peterson LN, Bienkowski MJ, Eessalu TE, Hebert SC.,** Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *Am J Physiol.* 1997; 273(5 Pt 2):F739-48.

**Xu ZC, Yang Y, Hebert SC.,** Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal Biological Chemistry.* 1996; 19;271(16):9313-9.

**Yang T.,** Regulation of cyclooxygenase-2 in renal medulla. *Acta Physiol Scand.* 177: 417-421, 2003, Review.

**Yang T, Schnermann J, Briggs JP.,** Regulation of cyclooxygenase-2 expression in renal me-dulla by tonicity in vivo and in vitro. *Am J Physiol.* 1999; 277(46): F1-F9.

**Yang T, Park JM, Arend L, Huang Y, Topaloglu R, Pasumarthy A, Praetorius H, Spring K, Briggs JP, Schnermann J.,** Low Chloride Stimulation of Prostaglandin E2 Release and Cyclooxygenase-2 Expression in a Mouse Macula Densa Cell Line. *JBC* 48(275):37922-37929, 2000.

**Zhang F, Warskulat U, Wettstein M, Schreiber R, Henninger HP, Decker K, Häussinger D.,** Hyperosmolarity stimulates prostaglandin synthesis and cyclooxygenase-2 expression in activated rat liver macrophages. *Biochem J.* 1995 Nov 15; 312 ( Pt 1):135-43.

**Zhou X, Wingo CS.,** Mechanisms of rubidium permeation by rabbit cortical collecting duct during potassium restriction. *Am J Physiol.* 1992; 263(6 Pt 2):F1134-41.

---

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung NKCC2-Transporter	12
Abb. 2	Arachidonsäurestoffwechsel	18
Abb. 3	Laufstrecke in cm in Bezug auf die Proteingröße in kDa	31
Abb. 4	Mikroskopisches Bild der Epithelzellen des TAL	38
Abb. 5	Positiver Nachweis des THP unter dem Fluoreszenzmikroskop	39
Abb. 6	Widerstand in $\Omega/\text{cm}^2$ in Abhängigkeit der Zellkulturtage (n=6)	40
Abb. 7	mRNA der Ionenkanäle NKCC2, ROMK und als Referenzwert $\beta$ -Actin	41
Abb. 8	mRNA des Enzyms PGES-1 und von COX-1 und COX-2	42
Abb. 9	Unbehandelte m-TAL-Zellen (n=6) .....	43
Abb. 10	m-TAL Zellen nach Inkubation mit Antikörper gegen EP1 .....	43
Abb. 11	m-TAL Zellen nach Inkubation mit Antikörper gegen EP2 .....	44
Abb. 12	m-TAL Zellen nach Inkubation mit Antikörper gegen EP3 .....	44
Abb. 13	m-TAL Zellen nach Inkubation mit Antikörper gegen EP4 .....	45
Abb. 14	m-TAL Zellen nach Inkubation mit Antikörper gegen COX-1 .....	46
Abb. 15	m-TAL-Zellen nach Inkubation mit Antikörper für COX-2. ....	46
Abb. 16	PGE <sub>2</sub> -Spiegel in ng/24h nach Inkubation mit der Standard+Furosemid .....	47
Abb. 17	PGE <sub>2</sub> -Spiegel in ng/24h nach Inkubation mit HYPO 2 .....	48
Abb. 18	PGE <sub>2</sub> -Spiegel in ng/24h nach Inkubation mit ISO HYPO 2 .....	49
Abb. 19	PGE <sub>2</sub> -Spiegel in ng/24h nach Inkubation mit HYPO 2+SB203580 .....	50

---

Abb. 20	RT-PCR-Analyse der mRNA Expression von COX-1, COX2 und $\beta$ -Actin	51
Abb. 21	Semiquantitative Analyse der Expression der COX-2 mRNA nach Stimulation mit HYPO 2, Standard+Furosemid und ISO HYPO 2	52
Abb. 22	RT-PCR-Analyse der mRNA Expression von COX-1, COX-2 und $\beta$ -Actin nach Stimulation mit HYPO 2 und HYPO 2+SB203580	53
Abb. 23	Semiquantitative Analyse der Expression der COX-2 mRNA nach Stimulation mit HYPO 2 und HYPO 2+SB 203580	54
Abb. 24	RT-PCR Analyse der mRNA-Expression von PGES-1	55
Abb. 25	Semiquantitative Analyse der Expression der mRNA von mPGES-1 nach Stimulation mit HYPO2, Standard+Furosemid und ISO HYPO 2	56
Abb. 26	RT-PCR Analyse der mRNA Expression von PGES-1 nach Stimulation mit HYPO 2 und HYPO 2+SB 203580	57
Abb. 27	Semiquantitative Analyse der mRNA Expression der mPGES-1 nach Stimulation mit HYPO 2 und HYPO 2+SB203580	57
Abb. 28	Western Blot Analyse der COX-1 und COX-2 Proteinexpression in primär kultivierten TAL-Zellen der Schweinenieren	58

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Genetische Charakterisierung des Bartter Syndroms	8
Tabelle 2	Klinische Charakterisierung des Bartter Syndroms	9
Tabelle 3	Elektrolytzusammensetzung und Osmolarität der Stimulationslösungen	26
Tabelle 4	Laufstrecke in cm in Bezug auf die Proteingröße in kDa	31
Tabelle 5	Basenzusammensetzungen der Primer	34

---

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Friederike Isabella Simon  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder  
Geburtsdatum: 15.10.1977  
Geburtsort: Heidelberg  
Gegenwärtige Anschrift: Görresstr. 5  
50674 Köln

### Schulbildung

1984-1988: Neuberg-Grundschule, Dossenheim  
1988-1997: Hölderlin-Gymnasium, Heidelberg  
06/1997: Abitur

### Hochschulausbildung

seit 1998: Studium der Humanmedizin,  
Philipps-Universität, Marburg  
03/2000: Physikum  
03/2001: 1. Staatsexamen  
04/2002-08/2003: Universitätswechsel, Fortführung des Studiums  
Technische Universität, München  
08/2003: 2. Staatsexamen  
08/2003-11/2004: Universitätswechsel, Fortführung des Studiums  
Universität zu Köln  
10/2003-02/2004: 1. Terial (Praktisches Jahr), Pädiatrie  
städtisches Kinderkrankenhaus, Köln-Riehl  
02/2004-06/2004: 2. Terial (Praktisches Jahr), Innere Medizin  
Klinikum Leverkusen  
06/2004-09/2004: 3. Terial (Praktisches Jahr), Chirurgie  
Klinikum Leverkusen  
11/2004: 3. Staatsexamen

**Praktische Tätigkeiten**

08/1997-10/1997:	pflegerische Tätigkeit, Universitätschirurgie, Heidelberg
08/1998-10/1998:	Pflegepraktikum, Chirurgie Krankenhaus Salem, Heidelberg
09/2000-10/2000:	Famulatur, Innere Medizin Krankenhaus Salem, Heidelberg
05/2001-04/2002:	Beschäftigung als studentische Mitarbeiterin im Schlafmedizinischen Labor, Universitätsklinikum Marburg
02/2002-03/2002:	Famulatur, Kardiologie Kreiskrankenhaus, Schwetzingen
07/2002-08/2002:	Famulatur, Kinderheilkunde Universitätskinderklinik, Marburg
09/2002-10/2002:	Famulatur, internistische Praxis Praxis Dr. med. Brigitte Reinart-Lißmann, Heidelberg

**Berufliche Tätigkeit**

Seit 01/05	Assistenzärztin der Inneren Medizin, Klinikum Leverkusen
------------	---

**Sprachkenntnisse**

Englisch (9 Jahre Gymnasium)  
Französisch (5 Jahre Gymnasium, Leistungskurs)  
Latein (5 Jahre Gymnasium)

## 10. Verzeichnis der akademischen Lehrer:

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Adamkiewicz, Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Bette, Cetin, Christiansen, Czubyko, Dauth, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fruhsdorfer, Gerdes, Geus, Gotzen, Grimm, Griss, Gudermann, Happle, Hasilik, Hofmann, Hörle, Jungclas, Kaluza, Kern, Klenk, Klose, Köhler, Koolmann, Krieg, Kroll, Lang, Leppek, Löffler, Lohoff, Mandrek, Maisch, Meinhardt, Meyer, Moll, Mueller U., Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Radsack, Rausch, Remschmidt, Renz, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Seifart, Seitz J., Steininger, Seybert, Sure, Vohland, Voigt, Wahl, Walther, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

Meine akademischen Lehrer in München waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Arnold, Brunner, Conrad, Förstl, Greim, Kochs Mader, Mertz, Nowak, Peters, Ring, Schömig, Siewert

Meine akademischen Lehrer in Köln waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Adamek, Niederle, Tauchert, Vestweber, Weiß

## **11. Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Rolf Nüsing für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas sowie seine intensive und hervorragende Betreuung und Geduld. Herrn Prof. Dr. med. Seyberth, danke ich für die Bereitstellung der Mittel und der Räumlichkeiten in seinem Institut. Ebenfalls danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors der Kinderklinik der Philipps-Universität Marburg für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

Außerdem danke ich meinen Eltern die mir dieses Studium ermöglicht haben und mir immer unterstützend zur Seite standen diese Arbeit zu beenden. Meiner Schwester danke ich für ihre Hilfe bei den Korrekturen.

Zuletzt danke ich meinem Mann für die Geduld und Unterstützung.



## **12. Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Untersuchungen zur Prostaglandin-abhängigen Pathogenese des antenatalen Bartter-Syndroms am Zellmodell primär kultivierter Nierenepithelzellen“ selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und dass ich alle von anderen Autoren wörtlich übernommenen Stellen wie auch die sich an die Gedankengänge anderer Autoren eng anlehenden Ausführungen meiner Arbeit besonders gekennzeichnet und die Quellen zitiert habe.

Köln, den 26.12.2012