

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologe  
**Christian Alexander Lechner**  
aus  
Wiesbaden

Tag der mündlichen Prüfung:

# **Nierenzellen als *In-vitro*-Modell zur Evaluierung der renalen Sekretion von Arzneistoffkandidaten**

**Gutachter:**

Prof. Dr. rer. nat. Gert Fricker

Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Hilgenfeldt



# Zusammenfassung

Ein großer Teil aller therapeutisch wirksamer Arzneistoffe sowie deren Metaboliten werden durch die Nieren aus dem Körper ausgeschieden. Neben der glomerulären Filtration und passiven Transportprozessen sind dabei vor allem aktive, durch Arzneistoff-Transporter vermittelte, Transportprozesse in den proximalen Tubuli maßgeblich von Bedeutung. Daher kann die renale Exkretionsrate zahlreicher Arzneistoffe sowohl durch Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen als auch durch Veränderung der Expressionsstärke oder der Aktivität einzelner Arzneistofftransporter beeinflusst werden. Derartige Änderungen können aufgrund verschiedener Faktoren wie Nierenerkrankungen, Alter, Schwangerschaft, Geschlecht, Ethnizität oder durch Polymorphismen der entsprechenden Transportergene hervorgerufen werden. Während der Entwicklung neuer Wirkstoffe ist es daher von großer Bedeutung, die beteiligten Transportprozesse in den proximalen Tubuluszellen zu identifizieren. Für die Charakterisierung von Arzneistoff-Kandidaten in Hinblick auf die aktive Sekretion wäre ein entsprechendes zellbasiertes *In-vitro*-Modell daher von großem Nutzen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene zellbasierte Modellsysteme im Hinblick auf ihre Eignung zur Darstellung der aktiven renalen Eliminierung untersucht. Dazu gehörten 1) frisch isolierte primäre proximale Tubuluszellen aus der Ratte, 2) für 5 Tage kultivierte proximale Tubuluszellen aus der Ratte, sowie 3) die immortalisierten Nierenzelllinien MDCKII, NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1.

Zunächst wurde eine Isolationsmethode für primäre proximale Tubuluszellen aus der Ratte etabliert. Die Bestätigung der Isolation wurde durch den Nachweis der proximalen Tubulusmarkerproteine alkaline Phosphatase (AP), Alanin-Aminopeptidase (ALPL), Villin 1 (VIL1) und  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 (GGT1) erbracht. Darüber hinaus konnte die mRNA von 18 in den proximalen Tubuli der Niere exprimierten Aufnahme- und Efflux-Transportern aus der ABC-, SLC- und SLCO-Familie nachgewiesen werden. Auf funktioneller Ebene zeigten die Zellen außerdem eine aktive Aufnahme des organischen Anions p-Aminohippurat (PAH), sowie des organischen Kations 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+).

Im nächsten Schritt wurden die isolierten primären proximalen Tubuluszellen kultiviert und anschließend charakterisiert. Parallel wurde die Charakterisierung auch mit den immortalisierten Nierenzelllinien durchgeführt und die Daten mit denen der Primärzellen verglichen. Da eine wichtige Voraussetzung für bidirektionale Transportstudien die Dichtigkeit der Zell-*Monolayer* ist, wurden die kultivierten Zellen auch im Hinblick auf deren Barriere-Eigenschaften untersucht. Die kultivierten proximalen Tubuluszellen zeigten eine Epithelzell-typische Morphologie und bildeten dichte *Monolayer* aus. Durch mRNA-Expressionsanalysen und immunohistochemische Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass sich das Expressionsmuster der untersuchten *Tight-Junction*-Proteine deutlich von dem der frisch isolierten proximalen Tubuluszellen unterschied. Dieses von der *In-vivo*-Situation abweichende

Expressionsmuster wurde ebenfalls in den untersuchten Nierenzelllinien beobachtet. Zudem zeigten die NRK-52E-, IHKE-1- und Caki-1-Zellen eine hohe Permeation von Mannitol, so dass diese für bidirektionale Transportstudien nicht geeignet sind.

Ein deutlicher Unterschied der Expressionsmuster zwischen den kultivierten proximalen Tubuluszellen und den frisch isolierten Zellen wurde jedoch nicht nur im Fall der *Tight-Junction*-Proteine, sondern auch bei den proximalen Tubulusmarkerproteinen, sowie bei den untersuchten Transportern beobachtet. Es wurde daher davon ausgegangen, dass sich die kultivierten Primärzellen in einem Status der Dedifferenzierung befanden. Auch die untersuchten Nierenzelllinien MDCKII, NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1 spiegelten nicht die Charakteristika der proximalen Tubuli wider und es wurden von den frisch isolierten Primärzellen abweichende Expressionsmuster der untersuchten Markerproteine und Transporter gefunden.

Im letzten Teil der Arbeit wurden daher verschiedene Ansätze untersucht, die Transporter-Expression in den kultivierten Primärzellen zu erhöhen. Die Behandlung der Zellen mit Modulatoren des Wnt/ $\beta$ -Catenin- und des *Notch*-Signalwegs, sowie die Behandlung mit den Steroidhormonen Testosteron und Hydrocortison hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Aufnahme von PAH und MPP<sup>+</sup> in die Zellen. Der Einsatz der Wachstumsfaktoren HGF, FGF-1 und EGF führte zu einer leichten Erhöhung der PAH-Aufnahme, während durch den Einsatz von 10 ng/ml EGF eine erhöhte MPP<sup>+</sup>-Aufnahme beobachtet werden konnte. Eine deutliche Erhöhung der Aufnahme von MPP<sup>+</sup> konnte durch Behandlung der kultivierten Primärzellen mit 25 mM Kreatinin erreicht werden. Möglicherweise führt die erhöhte Kreatinin-Konzentration durch einen Rückkopplungsmechanismus zu einer Induktion der Transporter-Expression.

## Summary

A large percentage of all therapeutic drugs and their metabolites are excreted from the body by the kidneys. In Addition to glomerular filtration and passive transport processes, drug transporter-mediated, active transport processes in the proximal tubule are thereby of great importance. Therefore, the renal excretion of many drugs can be altered by drug-drug interactions as well as changes in the expression levels and activities of particular drug transporters. These changes can be caused by various factors such as kidney diseases, age, pregnancy, gender, ethnicity or polymorphisms in the corresponding transporter genes. It is therefore of uttermost importance to identify the involved transport processes in the proximal tubule cells during the development of new therapeutic drugs. As a consequence, an adequate *in vitro* model for the characterization of drug candidates in regard to their active secretion would be of great interest.

In this work, several cell-based model systems were investigated to assess their potential to predict active renal elimination. The cell systems tested were 1) freshly isolated primary rat proximal tubule cells, 2) rat proximal tubule cells cultured for 5 days and 3) the immortalized kidney cell lines MDCKII, NRK-52E, IHKE-1 and Caki-1.

At first, an isolation method for primary proximal tubule cells from rat kidney was established. Confirmation of the isolation was done by detection of the proximal tubule marker proteins alkaline phosphatase (AP), alanine aminopeptidase (ALPL), villin 1 (VIL1) und  $\gamma$ -glutamyl transferase 1 (GGT1). Furthermore, mRNA of 18 uptake and efflux transporters of the ABC, SLC and SLCO families, which are expressed in the proximal tubule, was detected. On a functional level, the cells actively transported the organic anion para-aminohippuric acid (PAH) and the organic cation 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+).

Next, the isolated proximal tubule cells were cultivated and subsequently characterized. In parallel, the characterization was also conducted with the immortalized kidney cell lines and the results were compared to the primary cells. Because tightness of the cell monolayers is a pivotal prerequisite for bidirectional transport studies, the barrier properties of the cultivated cells were examined as well. The cultivated proximal tubule cells showed an epithelial cell-like morphology and formed tight monolayers. However, mRNA expression analyses and immunohistochemical studies revealed that the expression patterns of the investigated tight junction proteins was notably different from the freshly isolated proximal tubule cells. Expression patterns dissident from the *in vivo* situation were also found in the investigated kidney cell lines. Additionally, high levels of mannitol permeation were found in NRK-52E, IHKE-1 and Caki-1 cells, which is why they are unsuitable for bidirectional transport studies.

A clear difference between the expression patterns of cultivated proximal tubule cells and freshly isolated cells was not only observed in the case of tight junction proteins, but also in the case of the investigated proximal tubule marker and transport proteins. Hence, it was assumed that the cultivated primary cells were in a state of dedifferentiation. The investigated kidney cell lines MDCKII, NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1 also did not reflect the characteristics of proximal tubules and showed expression patterns of proximal tubule marker and transport proteins different from the freshly isolated primary cells.

As a consequence, various approaches to induce transporter expression in the cultivated primary cells were investigated in the last part of this work. Treatment of the cell with modulators of the Wnt/ $\beta$ -catenin and the notch signaling pathways, as well as treatment with the steroid hormones testosterone and hydrocortisone did not have a significant impact on the uptake of either PAH or MPP<sup>+</sup> into the cells. Utilization of the growth factors HGF, FGF-1 and EGF led to slightly elevated uptake of PAH, while the usage of 10 ng/ml EGF resulted in an elevated uptake of MPP<sup>+</sup>. A notable increase of MPP<sup>+</sup> uptake was achieved by treating the cultivated primary cells with 25 mM creatinine. It is possible, that the elevated creatinine levels cause an induction of transporter expression through a positive feedback mechanism.

# INHALTSVERZEICHNIS

---

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1 <i>Struktur und Physiologie der Niere</i> .....	9
1.1.1 Grundlegende physiologische Bedeutung der Niere .....	9
1.1.2 Makroskopische Anatomie der Niere.....	9
1.1.3 Die funktionelle und strukturelle Grundeinheit der Niere: Das Nephron.....	10
1.1.4 Die Rolle der Niere bei der Eliminierung von Arzneistoffen .....	11
1.2 <i>Proximale Tubuluszellen</i> .....	12
1.2.1 <i>Tight Junctions</i> in proximalen Tubuluszellen .....	13
1.2.2 Transportsysteme in proximalen Tubuluszellen .....	14
1.2.2.1 Arzneistofftransporter in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen	15
1.2.2.2 Arzneistofftransporter in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen ....	15
1.2.3 Arzneistofftransporter-vermittelte Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen in proximalen Tubuluszellen.....	16
1.3 <i>In-vitro-Modellsysteme zur Untersuchung des Arzneistofftransports in proximalen Tubuluszellen</i> .....	18
1.4 <i>Zielstellung der Arbeit</i> .....	18
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1 <i>Material</i> .....	20
2.1.1 Geräte und Hilfsmittel.....	20
2.1.2 Gerätesoftware .....	21
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.4 Chemikalien.....	22
2.1.4.1. Radioaktiv markierte Substanzen.....	23
2.1.4.2. Medien, Medienzusätze und sonstige Lösungen für die Zellkultur .....	23
2.1.5 Fertigkits.....	24
2.1.6 Puffer und Verbrauchslösungen.....	24
2.1.7 Antikörper .....	28

2.1.8	Primer .....	28
2.1.9	Zellkultur.....	31
2.1.9.1.	Zelllinien .....	31
2.1.9.2.	Zellkulturmedien .....	32
2.1.10	Versuchstiere.....	32
2.2	<i>Zellkulturtechniken</i> .....	33
2.2.1	Isolation und Kultivierung proximaler Tubuluszellen aus der Ratte .....	33
2.2.2	Isolation und Kultivierung proximaler Tubuluszellen aus dem Affen .....	34
2.2.3	Kollagen-Beschichtung .....	35
2.2.4	Kultivierung immortalisierter Zelllinien.....	35
2.2.5	Kryokonservierung der Zellen .....	35
2.2.6	Zellzahlbestimmung nach Neubauer.....	36
2.3	<i>Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene</i> .....	36
2.3.1	Allgemeines .....	36
2.3.2	RNA-Isolation.....	37
2.3.2.1	RNA-Quantifizierung und Kontrolle der RNA-Integrität.....	37
2.3.3	cDNA-Synthese .....	37
2.3.3.1	PCR zur Kontrolle der reversen Transkription.....	38
2.3.4	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR).....	38
2.4	<i>Expressionsanalysen und funktionelle Untersuchungen auf Protein-Ebene</i> .....	40
2.4.1	Proteinisolation .....	40
2.4.1.1	Herstellung von Gesamtlisat aus kultivierten Zellen.....	40
2.4.1.2	Isolation von Membranproteinen aus kultivierten Zellen .....	40
2.4.1.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	41
2.4.2	LDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE) .....	41
2.4.3	<i>Western Blot</i> .....	42
2.4.4	Immunfluoreszenz (IF).....	43
2.4.5	Bestimmung der Enzymaktivität von $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 (GGT1) .....	44
2.5	<i>Funktionelle Charakterisierungen der Zellen</i> .....	45
2.5.1	Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) .....	45
2.5.2	Transportstudien .....	45
2.5.2.1	Bidirektionale Transportversuche .....	45
2.5.2.2	Aufnahmeversuche mit Zell-Monolayern .....	48
2.5.2.3	Aufnahmeversuche mit Suspensionszellen.....	49

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
3.1	<i>Isolation und Kultivierung primärer proximaler Tubuluszellen .....</i>	51
3.2	<i>Grundlegende morphologische und physiologische Eigenschaften der untersuchten Zellmodelle .....</i>	52
3.2.1	Phänotypische Charakterisierung: Zellmorphologie und Integrität der Zell-Monolayer ..	52
3.2.2	Biochemische Charakterisierung: Expressionsanalyse von proximalen und distalen Tubulusmarkern .....	55
3.2.2.1	Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene mittels qPCR.....	55
3.2.2.2	Expressionsanalyse auf Protein-Ebene mittels Western Blot .....	59
3.2.2.3	Funktionelle Studien zum Nachweis der $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 .....	61
3.3	<i>Barriereigenschaften der untersuchten Zellmodelle .....</i>	62
3.3.1	Biochemische Charakterisierung: Expressionsanalyse von <i>Tight-Junction</i> -Proteinen .....	63
3.3.1.1	Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene mittels qPCR.....	63
3.3.1.2	Expressionsanalyse auf Protein-Ebene mittels Immunfluoreszenz .....	66
3.3.2	Funktionelle Charakterisierung: Dichtigkeit der Zell-Monolayer .....	76
3.3.2.1	Untersuchung des Transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) .....	76
3.3.2.2	Permeationseigenschaften der Monolayer: Bidirektionale Transportversuche mit Mannitol 77	
3.4	<i>Transporteigenschaften der untersuchten Zellmodelle.....</i>	81
3.4.1	Biochemische Charakterisierung: Expressionsanalyse von Transport-Proteinen .....	81
3.4.2	Funktionelle Charakterisierung: Transport von prototypischen Substraten .....	89
3.4.2.1	Bidirektionale Transportversuche mit PRPTC-Monolayern .....	91
3.4.2.2	Aufnahmeversuche mit kultivierten PRPTCs.....	92
3.4.2.3	Aufnahmeversuche mit frisch isolierten PRPTCs in Suspension .....	96
3.5	<i>Regulation der Transporter-Expression.....</i>	98
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>101</b>
4.1	<i>Auswahl der Zellmodelle .....</i>	102
4.2	<i>Isolation und Kultivierung primärer proximaler Tubuluszellen .....</i>	104
4.2.1	Überlegungen zur Isolationsmethode.....	105
4.2.2	Überlegungen zu den Kulturbedingungen .....	106
4.3	<i>Zellmorphologie und Integrität der Zell-Monolayer.....</i>	107
4.4	<i>Expression von proximalen und distalen Tubulusmarkern.....</i>	108

4.4.1	Expression der Markergene in frisch isolierten primären Nierenzellen .....	109
4.4.2	Expression der Markergene in den Nierenzelllinien .....	109
4.4.3	Expression der Markergene in kultivierten primären Nierenzellen.....	111
4.5	<i>Barriereeigenschaften der untersuchten Zellmodelle .....</i>	<i>114</i>
4.5.1	Barriereeigenschaften der frisch isolierten primären Nierenzellen.....	115
4.5.2	Barriereeigenschaften der kultivierten primären Nierenzellen .....	115
4.5.3	Barriereeigenschaften der Nierenzelllinien .....	118
4.5.4	Korrelation der elektrischen Widerstände mit den apparenten Permeationskoeffizienten von [ <sup>14</sup> C]-Mannitol.....	119
4.6	<i>Transporteigenschaften der untersuchten Zellmodelle.....</i>	<i>120</i>
4.6.1	Expression von Transport-Proteinen in frisch isolierten primären Nierenzellen.....	121
4.6.2	Expression von Transport-Proteinen in kultivierten primären Nierenzellen .....	122
4.6.3	Expression von Transport-Proteinen in den Nierenzelllinien.....	123
4.6.4	Aufnahmeversuche mit prototypischen Substraten .....	125
4.6.4.1	Transport organischer Anionen.....	125
4.6.4.2	Transport organischer Kationen.....	127
4.6.5	Regulation der Transporter-Expression .....	128
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>132</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

<b>ABC</b>	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
<b>Å</b>	Ångström
<b>ALPL</b>	Alkaline Phosphatase, <i>liver/bone/kidney</i>
<b>ANPEP</b>	Alanyl-Aminopeptidase
<b>ATCC</b>	<i>American type culture collection</i>
<b>AUC</b>	<i>Area under the curve</i>
<b>BCA</b>	<i>Bicinchoninic acid</i>
<b>BCRP</b>	<i>Breast cancer resistance protein</i>
<b>BIO</b>	6-Bromoindirubin-3'-Oxim
<b>Bis Tris</b>	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
<b>BLAST</b>	<i>Basic local alignment search tool</i>
<b>bp</b>	Basenpaar(e)
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>Caki-1</b>	<i>Carcinoma kidney-1</i>
<b>CCD</b>	<i>Charge-coupled device</i>
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i>
<b>CLDN</b>	Claudin
<b>C<sub>T</sub></b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>Cy3</b>	Cyanin 3
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DAPT</b>	N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-Alanyl]-S-Phenylglycine-t-Butyl-Ester
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	Doppelt destilliertes Wasser
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
<b>DMEM/F-12</b>	<i>Dulbecco's modified eagle medium/Ham's F-12</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>dsDNA</b>	doppelsträngige DNA
<b>DSMZ</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>dUTP</b>	Desoxyuridintriphosphat
<b>ECL</b>	Elektrochemilumineszenz
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i>
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FCS</b>	<i>Fetal calf serum</i>
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<b>f<sub>u</sub></b>	<i>fraction unbound</i>
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GFR</b>	Glomeruläre Filtrationsrate
<b>GGT</b>	γ-Glutamyltransferase
<b>GPNA</b>	γ-Glutamyl-p-Nitroanilid
<b>HBSS</b>	<i>Hank's balanced salt solution</i>
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HGF</b>	<i>Hepatocyte growth factor</i>
<b>HK</b>	Hexokinase
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i>

IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IE	Internationale Einheit
IF	Immunfluoreszenz
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IHKE-1	<i>Immortalized human kidney epithelial-1</i>
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
IVIVC	<i>in vitro-in vivo correlation</i>
IWR-1	<i>Interacting with RNA polymerase II protein 1</i>
K <sub>m</sub>	Michaeliskonstante
LDS	<i>Lithium dodecyl sulfate</i>
LDS-PAGE	Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
MATE	<i>Multidrug and toxin extrusion protein</i>
MDCKII	<i>Madin-Darby canine kidney II</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MeOH	Methanol
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPP+	1-Methyl-4-phenylpyridinium
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRP	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
NRK-52E	<i>Normal rat kidney-52E</i>
OAT	<i>Organic anion transporter</i>
OATP	<i>Organic anion transporting polypeptide</i>
OCLN	Occludin
OCT	<i>Organic cation transporter</i>
OCTN	<i>Organic cation transporter, novel</i>
pAb	<i>Polyclonal antibody</i>
PAH	p-Aminohippurat
P <sub>app</sub>	Apparenter Permeationskoeffizient
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEPT	<i>Peptide transporter</i>
P-gp	P-Glykoprotein
PMPTCs	<i>Primary monkey proximal tubular cells</i>
pNA	p-Nitroanilin
PRPTCs	<i>Primary rat proximal tubular cells</i>
PT	proximaler Tubulus
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>Quantitative real-time PCR</i>
RIPA	Radioimmunopräzipitations-Assay
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rotations per minute</i>
RPTEC	<i>Renal proximal tubule epithelial cell</i>
rRNA	ribosomale RNA
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SLC	<i>Solute carrier</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline-Tween 20</i>
TEA	Tetraethylammoniumion

<b>TEER</b>	<i>Transepithelial electrical resistance</i>
<b>TJP</b>	<i>Tight junction protein</i>
<b>T<sub>m</sub></b>	<i>Melting temperature</i>
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>U</b>	<i>Enzyme unit</i>
<b>UNG</b>	Uracil-DNA-Glycosylase
<b>URAT</b>	<i>Urate transporter 1</i>
<b>VE-Wasser</b>	vollentsalztes Wasser
<b>VIL</b>	Villin
<b>Wnt</b>	<i>Wingless/Int-1</i>

---

Allgemeines zur Nomenklatur: Gemäß der gängigen Konvention wurden Proteinnamen generell in Großbuchstaben geschrieben (ABC). Die Bezeichnungen für humane Gene und mRNA wurden kursiv und in Großbuchstaben (ABC) geschrieben. Für nicht-humane Gene und mRNA erfolgte die Schreibweise kursiv und klein mit großem Anfangsbuchstaben (*Abc*).

# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 STRUKTUR UND PHYSIOLOGIE DER NIERE

### 1.1.1 Grundlegende physiologische Bedeutung der Niere

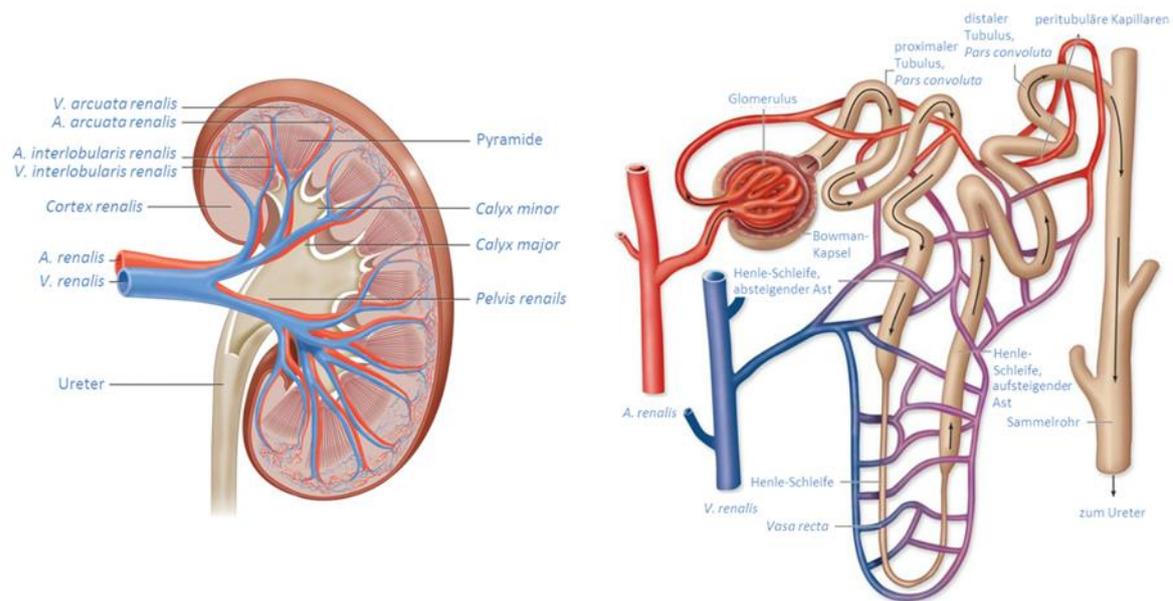
Die Niere hat vielfältige physiologische Funktionen im Körper. Sie ist beispielweise sowohl Produktionssort als auch Wirkort von zahlreichen Hormonen und ist auch an der Energieversorgung des Körpers durch Glukoneogenese beteiligt. Darüber hinaus sind die Nieren das Hauptausscheidungsorgan des Harnsystems. Durch die Bildung des Harns gewährleisten die Nieren die Aufrechterhaltung der extrazellulären Homöostase. Sie steuern durch Reabsorption und Sekretion das Gleichgewicht zahlreicher im Blut gelöster Substanzen und sind dadurch maßgeblich an verschiedenen systemischen Regelkreisläufen beteiligt. So wird durch die Reabsorption von Wasser und durch die Regulation der Konzentrationen verschiedener Ionen wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{PO}_4^{2-}$  der Wasser- und Elektrolythaushalt des Körpers durch die Nieren reguliert. Am Säure-Base-Haushalt sind die Nieren durch die Reabsorption und Sekretion von Bicarbonat- und  $\text{H}^+$ -Ionen ebenfalls beteiligt und sorgen so dafür, dass der pH-Wert des Blutes auf konstantem Niveau gehalten wird. Weiterhin wird durch die Kontrolle der Zusammensetzung des Harns auch die Ausscheidung der sogenannten harnpflichtigen Substanzen geregelt. Zu diesen gehören neben zahlreichen endogenen Abfallprodukten des Stoffwechsels wie Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin auch verschiedene Xenobiotika, darunter auch eine Reihe therapeutisch wirksamer Arzneistoffe.

### 1.1.2 Makroskopische Anatomie der Niere

Eine menschliche Niere hat im Durchschnitt eine Größe von  $12 \times 6 \times 3$  cm und ein Gewicht von 150–200 g. Obwohl die Nieren weniger als 1 % des Körpergewichts ausmachen, beträgt der renale Blutfluss etwa 22 % des Blutflusses im Herzen, das heißt die Nieren werden pro Minute mit etwa einem Fünftel des vom Herzen in den Blutkreislauf gepumpten Blutes durchströmt (Klinke, 2010). Beim Menschen und allen anderen Säugetieren liegen die Nieren als beidseitig der Wirbelsäure paarig angelegte, bohnenförmige Organe vor. Sie sind im Peritonealraum, unterhalb des Zwerchfells lokalisiert. An der konvexen Organseite befindet sich der Nierenhilus, an dem die renalen Blutgefäße und Nerven sowie der Harnleiter (Ureter) münden.

Die parenchymatische Nierensubstanz ist von einer dreischichtigen Nierenkapsel aus Fett- und Bindegewebe umgeben und lässt sich makroskopisch in zwei deutlich voneinander abgegrenzte Bereiche unterteilen: Die äußere Nierenrinde (*Cortex renalis*) und das innenliegende Nierenmark (*Medulla renalis*). Die Nierenrinde liegt unterhalb der fibrösen Kapsel und setzt sich in mehreren Säulen hiluswärts

durch das Nierenmark bis ins Innere des Organs fort. Das Nierenmark besteht aus den Nierenpyramiden, deren Spitzen in die Nierenkelche (*Calices renales*) hineinragen. Die Nierenkelche vereinigen sich schließlich zum Nierenbecken (*Pelvis renalis*). Von dort gelangt der in den Nieren konzentrierte Harn durch den Harnleiter in die Blase (siehe Abbildung 1-1).



**Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der Anatomie der Niere (links) und des Nephrons (rechts)**  
(modifiziert nach Leslie Samuel, [interactive-biology.com](http://interactive-biology.com); BaileyBio.com)

### 1.1.3 Die funktionelle und strukturelle Grundeinheit der Niere: Das Nephron

Die Basiseinheit der Niere, in der die Bildung des Harns stattfindet, ist das Nephron (siehe Abbildung 1-1). Jedes Nephron unterteilt sich in Nierenkörperchen (*Corpuscula renalis*) und Nierenkanälchen (*Tubulus renalis*) und durchspannt in seiner Gesamtheit die Niere von der Nierenrinde bis ins Nierenmark.

Die Nierenkörperchen bestehen aus einem feinen Netz von Kapillargefäßen, dem *Glomerulum* und einer das *Glomerulum* umgebenden Epithelkapsel, der sogenannten Bowman-Kapsel. In den Nierenkörperchen findet der erste Schritt der Harnbildung, die glomeruläre Filtration, statt. Bei dieser Ultrafiltration wird ein Teil des afferenten Bluts durch die fenestrierten Kapillarwände des Glomerulums in die Bowman-Kapsel filtriert. Zellen, Proteine und andere hochmolekulare Plasmabestandteile werden durch die Größen- und Ladungsselektivität der auch als Blut-Harn-Schranke bezeichneten Barriere im Blutkreislauf zurückgehalten, während der restliche Anteil als sogenannter Primärharn in die Bowman-Kapsel gelangt. Auf diese Weise werden beim Menschen etwa 120 ml Primärharn pro Minute filtriert (glomeruläre Filtrationsrate, GFR).

Der Primärharn enthält neben harnpflichtigen Substanzen vor allem Wasser und lösliche Nährstoffe, die dem Organismus wieder zugeführt werden müssen. Deren Rückresorption stellt zusammen mit der

aktiven Sekretion harnpflichtiger Stoffe den zweiten Schritt der Harnbildung dar und findet in dem sich dem Nierenkörperchen anschließenden Tubulussystem statt. Von der Bowman-Kapsel gelangt der Primärharn zunächst in den proximalen Tubulus (PT), der in einen gewundenen Teil (*Pars convoluta*) und einen geraden Teil (*Pars recta*) unterteilt wird. Der überwiegende Anteil der tubulären Reabsorptions- und Sekretionsprozesse im Nephron findet in der *Pars convoluta* des proximalen Tubulus statt. In den proximalen Tubuli werden unter anderem 100 % der Glucose und Aminosäuren, sowie ein Großteil der Elektrolyte und 65 % des Wassers in den Blutkreislauf zurückgeführt (Klinke, 2010).

Der so entstandene Sekundärharn gelangt im Anschluss in die *Pars recta* des proximalen Tubulus, die funktionell bereits zur Henle-Schleife gezählt wird und sich in einen absteigenden dünnen Teil (*Pars descendens*) und einen aufsteigenden dünnen Teil aufteilt (*Pars ascendens*). Daran schließt sich der auch als dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife bezeichnete gerade distale Tubulus an, der sich in den gewundenen distalen Tubulus fortsetzt. Dieser stellt den letzten Teil des Nephrons dar und ist durch ein Verbindungsstück mit dem Sammelrohr verbunden. In der Henle-Schleife, dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr findet eine weitere Aufkonzentrierung des Harns durch Rückresorption des Wassers sowie durch die Reabsorption verbliebender Ionen statt. Insgesamt werden im Tubulussystem der Nierenkanälchen etwa 99 % des filtrierten Wassers reabsorbiert, so dass bei einer GFR von 120 ml/min lediglich 1–2 ml/min als Urin den Körper verlassen (Perri *et al.*, 2003).

#### **1.1.4 Die Rolle der Niere bei der Eliminierung von Arzneistoffen**

Die zugrundeliegenden Mechanismen bei der Ausscheidung einer Substanz durch die Nieren sind die drei zuvor beschriebenen physiologischen Vorgänge in den Nephronen: Glomeruläre Filtration, tubuläre Reabsorption und tubuläre Sekretion. Die glomeruläre Filtration ist ein rein passiver Prozess, bei dem nur kleine und nicht an Plasmaproteine gebundene Substanzen frei filtriert werden.

Bei der tubulären Reabsorption findet ein vektorieller Transport der Substanzen vom Tubuluslumen in die Epithelzellen des proximalen Tubulus und von dort über das Interstitium in die peritubulären Kapillaren und somit zurück in den Blutkreislauf statt. Existiert für eine Substanz ein Konzentrationsgefälle zwischen dem Tubuluslumen und den proximalen Tubuluszellen kann, in Abhängigkeit von den elektrochemischen Eigenschaften der Substanz, eine passive Reabsorption durch einfache oder erleichterte (Kanalprotein- oder *Carrier*-vermittelte) Diffusion erfolgen. Da die meisten Arzneistoffe Anionen oder Kationen sind und daher nicht passiv durch die Zellmembranen diffundieren spielt die einfache Diffusion für die renale Eliminierung von Arzneistoffen nur eine untergeordnete Rolle (Perri *et al.*, 2003). Eine Reabsorption ist aber auch entgegen eines Konzentrationsgefälles möglich. In diesem Fall, wie beispielsweise bei Glucose, wird die Substanz von spezifischen Transportern aktiv unter Energieverbrauch in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen.

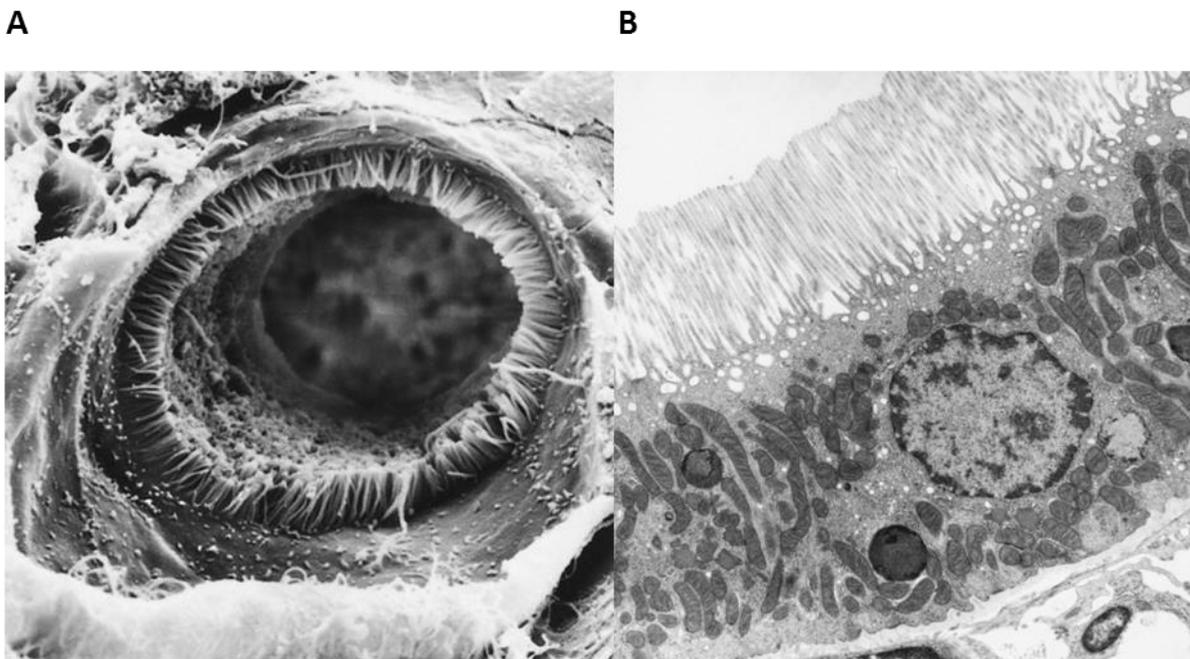
Aktive Transportprozesse sind auch die Grundlage der tubulären Sekretion, bei der ein vektorieller Transport in umgekehrte Richtung, von den peritubulären Kapillaren über das Interstitium in die proximalen Tubuluszellen und von dort in das Tubuluslumen stattfindet. Passive Transportprozesse sind bei der Sekretion in der Regel vernachlässigbar, da die auszuscheidenden Substanzen im Tubuluslumen akkumulieren und daher stets entgegen eines Konzentrationsgradienten transportiert werden müssen (Perri *et al.*, 2003). Die allermeisten renal eliminierten Arzneistoffe unterliegen im Nephron einer tubulären Sekretion und nur ein geringer Anteil wird tubulär reabsorbiert (Morrissey *et al.*, 2013).

## 1.2 PROXIMALE TUBULUSZELLEN

In den Nephronen findet man mindestens 15 verschiedene Typen von Epithelzellen die alle unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen besitzen (Baer *et al.*, 1997). Die überwiegende Mehrheit aller renaler Reabsorptions- und Sekretionsprozesse findet jedoch in den proximalen Tubuluszellen statt. Von den übrigen Epithelzellen des Tubulussystems lassen sich die proximalen Tubuluszellen anhand verschiedener Parameter wie der Expression spezifischer Markergene, der Aktivität verschiedener Enzyme oder der Beeinflussbarkeit durch Hormone unterscheiden (Helbert *et al.*, 1999). Zu den spezifischen Markern für den proximalen Tubulus gehören beispielsweise Villin 1 (VIL1),  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 (GGT1), Alanin-Aminopeptidase (ANPEP) und alkaline Phosphatase *liver/bone/kidney* (ALPL) (Baer *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 1996; Courjault-Gautier, 1995; Evans, 1994; Glube *et al.*, 2007b; Guder and Ross, 1984; Lash and Tokarz, 1989; Lash, 2001; Qi *et al.*, 2007; Rahmoune *et al.*, 2005; Sikka and McMartin, 1996; Terryn *et al.*, 2007; Toutain *et al.*, 1990; Van der Hauwaert *et al.*, 2013; Gildea *et al.*, 2010; Glube *et al.*, 2007b; Schwarz *et al.*, 2002; Van der Hauwaert *et al.*, 2013; Wilmer *et al.*, 2005; Boogaard *et al.*, 1990; Dietrich *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2009; Weiland *et al.*, 2007; Kemmer, 2005).

Neben der strukturellen und funktionellen Unterteilung des proximalen Tubulus in *Pars convoluta* und *Pars recta* wird anhand der Zellmorphologie auch eine Unterteilung in die drei Segmente S1, S2 und S3 vorgenommen. Dabei werden das S1- und S2-Segment zur *Pars convoluta* und das S3-Segment zur *Pars recta* gezählt. Charakteristisch für alle proximalen Tubuluszellen sind eine für einschichtige Epithelzellen typische kubische Zellform sowie eine ausgeprägte Polarität zwischen apikaler und basolateraler Seite. Insbesondere S1- und, in etwas eingeschränktem Maße auch die S2- und S3-Zellen, besitzen zur Oberflächenvergrößerung einen ausgeprägten Bürstensaum (*brush border*) mit zahlreichen Mikrovilli an der apikalen Seite (siehe Abbildung 1-2). Sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Membran finden sich zahlreiche Transportsysteme für den Stoffaustausch zwischen den Zellen und dem Tubuluslumen beziehungsweise dem basalen Interstitium. Im Cytoplasma aller proximalen Tubuluszellen befindet sich aufgrund der Vielzahl an energieverbrauchenden Transportvorgängen außerdem eine große Zahl von Mitochondrien (siehe Abbildung 1-2). Die proximalen Tubuluszellen bilden zusammen

einen *Monolayer* der das Tubuluslumen auskleidet und die spezifische Barriereigenschaften des proximalen Tubulus bestimmt.



**Abbildung 1-2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des proximalen Tubulus einer Ratte.**

A: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Übergangs von der Bowman-Kapsel in das S1-Segment, B: Transmissionsmikroskopische Aufnahme der Epithelzellen des S1-Segments. Deutlich erkennbar sind die ausgeprägten Mikrovilli (A, B) sowie die zahlreichen Mitochondrien (B). (Taal *et al.*, 2012)

### 1.2.1 *Tight Junctions* in proximalen Tubuluszellen

Die spezifischen Barriereigenschaften des proximalen Tubulus-Epithels werden hauptsächlich von der Funktionsfähigkeit der apikalen Verbindungskomplexe bestimmt. Diese sind mitentscheidend für die Durchlässigkeit des Epithels für Ionen und Moleküle und außerdem zur Aufrechterhaltung der Zellpolarität notwendig (Prozialeck *et al.*, 2006). Die apikalen Verbindungskomplexe bestehen aus den Adhärenzverbindungen (*Adherens Junctions*, AJs) und den *Zonulae occludens* oder *Tight Junctions* (TJs). Entscheidend für die parazelluläre Permeabilität eines Epithels sind vor allem die *Tight Junctions*. Dabei handelt es sich um Multiprotein-Komplexe, die sich aus unterschiedlichen Membranproteinen wie Occludin und den Mitgliedern der Claudin-Familie zusammensetzen. Weitere, mit Claudin und Occludin assoziierte Proteine wie beispielsweise das *Tight Junction Protein 1* (TJP1), verbinden die *Tight Junctions* mit dem Aktin-Cytoskelett der Zelle. Durch Occludin und die Claudine werden größen- und ladungsselektive Poren zwischen den Zellen gebildet. Jedes Claudin weist dabei eine spezifische Selektivität auf. Daher ist die Zusammensetzung der Claudine für die Durchlässigkeit der *Tight Junctions* für verschiedene Ionen und Moleküle verantwortlich (Anderson *et al.*, 2004). In Säugetieren sind bislang 24 Mitglieder der Claudin-Familie bekannt, deren Zusammensetzung sich zwischen den verschiedenen

epithelialen Barrieren unterscheidet. Im Nephron der Niere werden in den einzelnen Segmenten unterschiedliche Claudine exprimiert. Charakteristisch für den proximalen Tubulus sind vor allem Claudin-2, Claudin-7 und Claudin-10 (Kiuchi-Saishin *et al.*, 2002; Prozialeck *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2002). Occludin und TJP1 werden hingegen in allen Nephron-Segmenten exprimiert (Kemmer, 2005; Reyes *et al.*, 2002).

### 1.2.2 Transportsysteme in proximalen Tubuluszellen

Zusammen mit der Permeabilität der *Tight Junctions* entscheiden die in der Zellmembran vorkommenden aktiven und passiven Transportsysteme darüber, welche Ionen und Moleküle über das proximale Tubulus-Epithel transportiert werden. Sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen werden eine Reihe von Transportern exprimiert, die an der renalen Exkretion von Nähr- und Giftstoffen sowie von Xenobiotika, wie einer Vielzahl therapeutisch wirksamer Arzneistoffe, zusammenwirkend beteiligt sind. Durch die polarisierte Expression unterschiedlicher Transporter in apikaler und basolateraler Membran wird ein gerichteter Transport von Substanzen von den peritubulären Kapillaren durch die proximalen Tubuluszellen in das Tubuluslumen (tubuläre Sekretion) beziehungsweise in die entgegengesetzte Richtung (tubuläre Reabsorption) ermöglicht. Man unterscheidet Aufnahme-Transporter, die Substanzen in die Zellen hinein transportieren und sogenannte Efflux-Transporter, welche den Transport von Substanzen aus der Zelle heraus vermitteln. Die Aufnahmetransporter gehören zur Superfamilie der SLC-Transporter (*Solute carrier transporter*) und vermitteln einen erleichterten Transport entlang eines elektrochemischen Gradienten oder einen sekundär-aktiven Co-Transport entgegen eines elektrochemischen Gradienten. Insgesamt sind im Menschen etwa 400 SLC-Transporter bekannt, die in 48 Unterfamilien unterteilt werden. Die Efflux-Transporter sind Mitglieder der ABC-Transporter-Superfamilie (*ATP-binding cassette transporter*), die im Menschen aus 48 Mitgliedern in 7 Unterfamilien besteht (Giacomini *et al.*, 2010). Diese transportieren das Substrat gegen einen elektrochemischen Gradienten unter Verbrauch von durch ATP-Hydrolyse gewonnener Energie aus der Zelle heraus. Bezüglich ihrer Substratspezifität lassen sich die in den proximalen Tubuluszellen vorkommenden Transporter auch in solche, die vorrangig organische Anionen (OA<sup>-</sup>) und in solche, die vorrangig organische Kationen (OK<sup>+</sup>) transportieren, untergliedern. Im Hinblick auf die Expression der Transporter in verschiedenen Spezies wurden deutliche Unterschiede der Expressionsmuster beschrieben. So werden in den proximalen Tubuluszellen des Menschen zum Teil andere Transporter exprimiert als in den proximalen Tubuluszellen der Ratte (Hilgendorf *et al.*, 2007). Die wichtigsten Arzneistofftransporter in den proximalen Tubuluszellen im Menschen und in der Ratte sind in Abbildung 1-3 dargestellt.

Die Nieren erfüllen durch die Harnbildung, wie bereits erwähnt, auch eine wichtige Funktion bei der Ausscheidung von Arzneistoffen. Die Exkretion durch die Nieren ist, neben der Metabolisierung in der

Leber, der wichtigste Eliminierungsweg für Arzneistoffe und es ist bekannt, dass ein Großteil aller therapeutisch wirksamen Arzneistoffe beziehungsweise deren Metaboliten renal ausgeschieden werden (Morrissey *et al.*, 2013). Neben der glomerulären Filtration spielen aktive Transportprozesse (aktive Sekretion und Rückresorption) in den proximalen Tubuli dabei eine wesentliche Rolle. Bei diesen renalen aktiven Arzneistoff-Transportprozessen sind eine Serie von Aufnahme- und Efflux-Transportern involviert, auf die in den nachfolgenden Kapiteln näher eingegangen wird.

### **1.2.2.1 Arzneistofftransporter in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen**

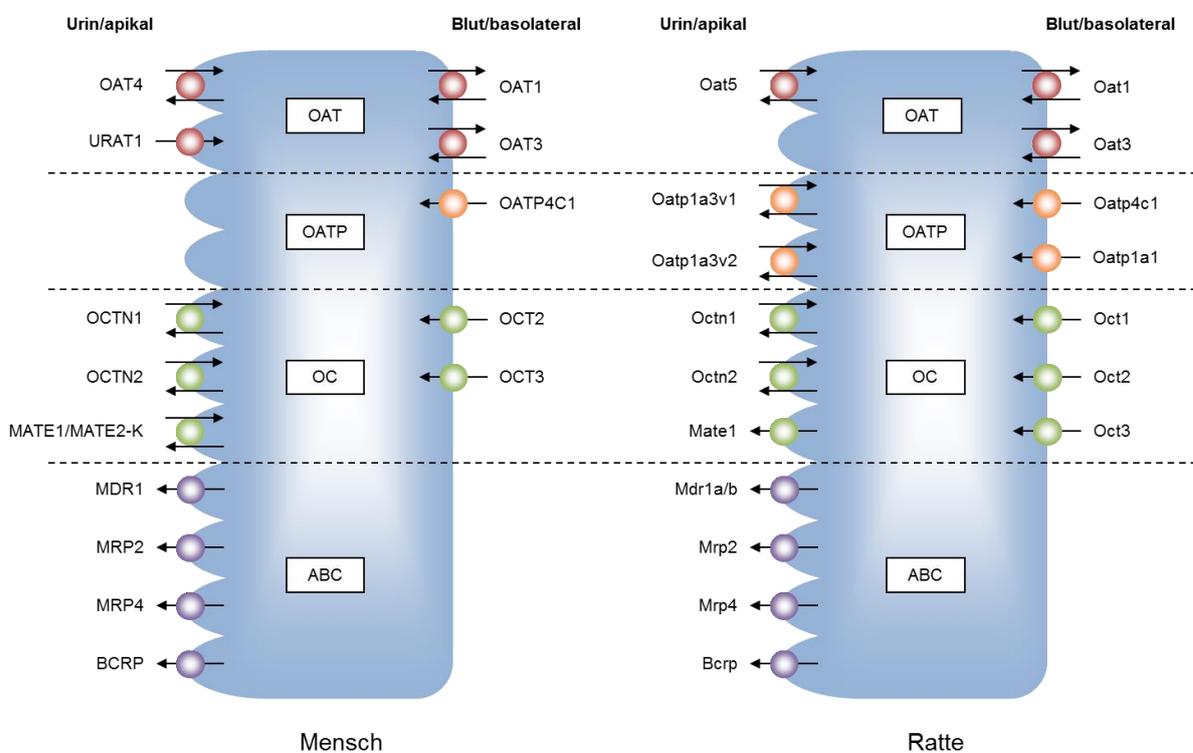
Bei der tubulären Sekretion werden die aus dem Blut zu eliminierenden Substanzen an der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen aufgenommen. Dazu werden dort verschiedene Aufnahme-Transporter aus der SLC-Familie exprimiert. Bei der Aufnahme organischer Kationen spielen vor allem die organischen Kationen-Transporter (*Organic cation transporter*, OCT) aus der SLC22-Unterfamilie eine Rolle. Der beim Menschen im Hinblick auf die Eliminierung von kationischen Wirkstoffen wichtigste Transporter in der basolateralen Membran ist OCT2 (*SLC22A2*). In der Ratte ist zusätzlich auch Oct1 (*Slc22a1*) von Bedeutung. Die Aufnahme anionischer Wirkstoffe wird hauptsächlich durch die organischen Anionen-Transporter (*Organic anion transporter*, OAT) OAT1 (*SLC22A6*) und OAT3 (*SLC22A8*) aus der SLC22-Unterfamilie, sowie durch das organische Anionen-Transporter-Polypeptid (*Organic anion transporting polypeptide*, OATP) OATP4C1 (*SLCO4C1*) aus der SLCO-Unterfamilie vermittelt. OAT2 (*SLC22A7*), welches ebenfalls in der apikalen Membran exprimiert wird, scheint nur eine geringere Rolle bei der Aufnahme von anionischen Arzneistoffen in die proximalen Tubuluszellen zu spielen (Cheng *et al.*, 2012). In den proximalen Tubuluszellen der Ratte ist außerdem auch Oatp1a1 (*Slco1a1*) an der Aufnahme von organischen Anionen beteiligt (Kuo *et al.*, 2012; Lee and Kim, 2004).

### **1.2.2.2 Arzneistofftransporter in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen**

Die auf der basolateralen Seite der proximalen Tubuluszellen aufgenommenen Anionen und Kationen werden auf der gegenüberliegenden apikalen Seite durch verschiedene Transporter in das Tubuluslumen sekretiert. Da es sich dabei um einen Transport aus den Zellen heraus handelt, werden diese Transportprozesse vorrangig durch Efflux-Transporter vermittelt. Die im Menschen wichtigsten Transporter in Hinblick auf die tubuläre Sekretion von Arzneistoffen sind die ABC-Transporter P-Glykoprotein oder *Multidrug resistance protein 1* (MDR1, *ABCB1*), das *Breast cancer resistance protein* (BCRP, *ABCG2*) sowie die beiden Vertreter der *Multidrug resistance-related proteins* (MRPs) MRP2 (*ABCC2*) und MRP4 (*ABCC4*). Neuere Studien haben gezeigt, dass auch MATE1 (*SLC47A1*) und MATE2-K (*SLC47A2*) aus der SLC47-Unterfamilie der *Multidrug and toxin extrusion proteins* (MATE) bei der Sekretion von kationischen Wirkstoffen von Bedeutung sind (Giacomini *et al.*, 2010), wobei die Expression von MATE2-K sich auf den Menschen beschränkt. Daneben werden in der apikalen Membran auch

einige Aufnahmetransporter exprimiert, die unter anderem an der tubulären Reabsorption verschiedener endogener Substanzen und Arzneistoffe beteiligt sind. Dazu gehören beispielsweise die SLC22-Transporter OCTN1 (*SLC22A4*), OCTN2 (*SLC22A5*) und URAT1 (*SLC22A12*) sowie die Peptidtransporter PEPT1 (*SLC15A1*) und PEPT2 (*SLC15A2*). Weiterhin von Bedeutung sind OAT4 (*SLC22A9*), welches nur im Menschen zu finden ist, und der Ratten-spezifische Anionen-Transporter Oatp1a3 (*Slco1a3*).

Das Zusammenspiel der genannten Arzneistofftransporter in der basolateralen und apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen ist mitentscheidend für die Nephrotoxizität und das pharmakokinetische Profil vieler Arzneistoffe. Darüber hinaus kann es bei gleichzeitiger Einnahme mehrerer Arzneistoffe durch Interaktion mit den genannten Transportern zu klinisch relevanten Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen kommen.



**Abbildung 1-3: Wichtige Arzneistofftransporter in den proximalen Tubuluszellen im Menschen und in der Ratte**

OAT/Oat: Organic anion transporter; URAT: Urate transporter 1; OATP/Oatp: Organic anion transporting polypeptide; OC: Organic cation; OCTN/Octn: Organic cation transporter, novel; MATE/Mate: Multidrug and toxin extrusion protein; ABC: ATP-binding cassette transporter; MDR/Mdr: Multidrug resistance; MRP/Mrp: Multidrug resistance-associated protein; BCRP/Bcrp: Breast cancer resistance protein

### 1.2.3 Arzneistofftransporter-vermittelte Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen in proximalen Tubuluszellen

In klinischen Studien der letzten Jahre hat sich gezeigt, dass neben den Cytochrom-P450-Enzymen auch die Arzneistofftransporter eine entscheidende Rolle bei der Absorption, Verteilung und Eliminierung

von Arzneistoffen spielen. Da ein Großteil aller therapeutischen Arzneistoffe beziehungsweise deren Metaboliten renal ausgeschieden werden, hat das Verständnis der zugrundeliegenden Transportmechanismen in der Niere einen besonders hohen Stellenwert. In der präklinischen pharmakokinetischen Evaluierung neuer Wirkstoffe ist vor allem die Kenntnis möglicher Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen von Bedeutung. Ähnlich wie bei durch die Cytochrom-P450-Enzyme hervorgerufenen, metabolischen Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen kann es durch Transporter-vermittelte Wechselwirkungen zu erheblichen Schwankungen der Plasmakonzentrationen und damit einhergehend zu verstärkten Nebenwirkungen kommen. Insbesondere bei Arzneistoffen mit einer kleinen therapeutischen Breite ist dies von großer Bedeutung. Der häufigste zugrundeliegende Mechanismus ist die Inhibition von basolateralen Aufnahmetransportern und/oder apikalen Efflux-Transportern durch einen Arzneistoff, welche in einer verringerten tubulären Sekretion und damit in einer Erhöhung der Plasmakonzentration eines parallel verabreichten Arzneistoffs resultiert (Li *et al.*, 2006).

Ein seit längerem bekanntes Beispiel für eine solche Transporter-vermittelte Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktion von klinischer Bedeutung ist der Effekt des H<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten Cimetidin auf die Plasmakonzentration des häufig verwendeten Antidiabetikums Metformin. Bei gleichzeitiger Verabreichung beider Substanzen wurde eine Erhöhung der *Area under the curve* (AUC) von Metformin um 50 % sowie eine Verringerung der renalen Metformin-*Clearance* um 30 % beobachtet (Somogyi *et al.*, 1987). Darüber hinaus wurde ein ähnlicher Effekt von Cimetidin auf die Pharmakokinetik einer Reihe weiterer Arzneistoffe wie Cephalexin, Ranitidin, Procainamid oder Pilsicainid beschrieben (van Crugten *et al.*, 1986; Shiga *et al.*, 2000; Somogyi *et al.*, 1983). Zahlreiche *In-vitro*-Studien deuten darauf hin, dass die beobachteten klinischen Phänomene auf eine Inhibition der basolateralen Aufnahme durch den organischen Kation-Transporter OCT2 beziehungsweise eine Inhibition des MATE-vermittelten apikalen Effluxes durch Cimetidin zurückzuführen sind.

Für anionische Wirkstoffe sind ebenfalls entsprechende Wechselwirkungen beschrieben. Ein prominentes Beispiel hierfür ist etwa die Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von Penicillin bei gleichzeitiger Gabe des Urikosurikums Probenecid. In diesem Fall wird die OAT-vermittelte Aufnahme von Penicillin in die proximalen Tubuluszellen durch Probenecid inhibiert. Diesen Effekt macht man sich beispielsweise bei der Koadministration von Probenecid und Cidofovir zunutze. Da Cidofovir stark nephrotoxisch wirkt, wird parallel Probenecid verabreicht um die Aufnahme in die proximalen Tubuluszellen zu hemmen (Cihlar *et al.*, 1999; Cundy *et al.*, 1995).

Die genannten Beispiele verdeutlichen, dass das Wissen um die (renalen) Transporteigenschaften eines neuen Wirkstoffs vor allem zur Abschätzung von möglichen Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen von großer Bedeutung ist. Daher sind auch in den aktuellen Leitlinien zur Untersuchung von Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen der Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (*Food and Drug*

Administration, FDA) sowie der Europäischen Arzneimittel-Agentur (*European Medicines Agency*, EMA) eine Reihe von *In-vitro*-Transportstudien vorgeschrieben (Food and Drug Administration, 2012; European Medicines Agency, 2012).

### **1.3 IN-VITRO-MODELLSYSTEME ZUR UNTERSUCHUNG DES ARZNEISTOFFTRANSPORTS IN PROXIMALEN TUBULUSZELLEN**

Zur Untersuchung der Aktivität von Arzneistofftransportern existiert eine Reihe von verschiedenen *In-vitro*-Modellen. Klassische Modellsysteme umfassen beispielsweise isolierte perfundierte Nieren beziehungsweise isolierte Nephronen und renale Gewebeschnitte. Renale Gewebeschnitte sind als Modell für den Arzneistofftransport in den proximalen Tubuli nur begrenzt einsetzbar, da mit diesen aufgrund der kollabierten Lumina nur der basolaterale Transport untersucht werden kann (Boom *et al.*, 1992). Mit den, zumeist aus der Ratte oder dem Kaninchen stammenden, isolierten Nieren oder Tubuli lassen sich hingegen aussagekräftigere Informationen bezüglich des Arzneistofftransports generieren. Allerdings handelt es sich bei beiden um komplizierte Verfahren, die ein kostenintensives experimentelles *Set-up* benötigen und nur durch Experimentatoren mit fortgeschrittenen technischen Fähigkeiten durchgeführt werden können. Zellbasierte Modelle haben dementsprechend gegenüber den komplexeren Modellen den Vorteil geringer Kosten und einem höherem Durchsatz (Jennings *et al.*, 2008). Daher werden derartige Zellmodelle zunehmend bei der Erforschung und Entwicklung neuer Wirkstoffe eingesetzt. Um die Funktion einzelner Arzneistofftransporter zu untersuchen, werden häufig Zellen verwendet, die einzelne Transporter stabil oder transient überexprimieren. Als Wirtszellen dienen dabei etablierte Zelllinien, wie etwa *Madin-Darby canine kidney*- (MDCK-), *Human embryonic kidney 293*- (HEK293-) oder *Chinese hamster ovary*-Zellen (CHO-Zellen). Mittlerweile werden auch zunehmend doppelt oder mehrfach transfizierte Zellen, welche zwei oder mehr rekombinante Transporter exprimieren, eingesetzt. Mit Hilfe solcher Zellen kann beispielsweise durch gleichzeitige Expressierung eines basolateralen Aufnahme- und eines apikalen Efflux-Transporters, der gerichtete Substanztransport über einen Zell-Monolayer untersucht werden. Derartige Zellmodelle sind zur Aufklärung der Transport-Mechanismen und -Eigenschaften einzelner Transporter sehr hilfreich und haben entscheidend zum Wissen über die Funktion der Arzneistofftransporter beigetragen. Viele Substanzen werden allerdings von mehreren Transportern als Substrat erkannt, so dass die genannten Zellmodelle nur bedingt einen Rückschluss darüber erlauben, wie ein Wirkstoff *in vivo*, das heißt von Zellen die viele verschiedene Transporter mit unterschiedlichen Expressionsstärken exprimieren, transportiert wird.

### **1.4 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT**

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollten verschiedene renale Zellsysteme auf ihre Eignung als *In-vitro*-Modellsystem für die Analyse des renalen Arzneimitteltransports untersucht werden. Dazu

sollten verschiedene renale Zelllinien sowie primäre proximale Tubuluszellen auf ihre Dichtigkeit sowie hinsichtlich ihrer Transporter-Expression beziehungsweise Transporter-Aktivität überprüft werden. Als immortalisierte Zellmodelle sind eine Reihe von ursprünglich aus der Niere unterschiedlicher Spezies hervorgegangenen Zelllinien wie etwa MDCKII, *Normal rat kidney-52E* (NRK-52E), *Immortalized human kidney epithelial-1* (IHKE-1) oder *Carcinoma kidney-1* (Caki-1) kommerziell erhältlich. Um eine primäre renale Zellkultur zu etablieren, war es zunächst erforderlich, die Isolation von primären proximalen Tubuluszellen zu optimieren. Nachfolgend sollten dann sowohl die Primärzellkulturen als auch Kulturen der renalen Zelllinien biochemisch auf ihre Dichtigkeit hin überprüft werden. Im nächsten Schritt sollte dann die Untersuchung der Transporter-Expression sowohl auf molekularer Ebene als auch auf funktioneller Ebene erfolgen. Die zentrale Frage war dabei stets, wie gut die verschiedenen Modelle die *In-vivo*-Eigenschaften der proximalen Tubuluszellen in Hinblick auf ihre Funktion als Barriere-Epithel widerspiegeln.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

### 1.5 MATERIAL

#### 1.5.1 Geräte und Hilfsmittel

##### Allgemein

Analysewaage	<i>AT261 DeltaRange</i>	Mettler-Toledo, Gießen
Flüssigszintillationszähler	<i>Tri-Carb® 2900TR</i>	PerkinElmer, Rodgau
Homogenisator	POTTER S	B. Braun, Melsungen
Magnetrührer	<i>RET basic IKAMAG®</i>	IKA Werke, Staufen
Multilabel-Plattenlesegerät	GENios™ <i>Wallac 1420 Multilabel Counter</i>	Tecan, Crailsheim PerkinElmer, Rodgau
pH-Meter	Portamess	Knick, Berlin
Pipetten	<i>Reference</i> <i>Research</i>	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg
Plattenschüttler	<i>VXR basic Vibrax®</i>	IKA Werke, Staufen
Präzisionswaage	CP224S	Sartorius, Göttingen
Tiefkühlagerschrank	<i>HERAfreeze® HFU 586 Top</i>	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Tischzentrifuge	<i>5417 R Centrifuge</i>	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Model 3862	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Ultrazentrifuge	<i>L8-60M Ultracentrifuge</i>	Beckman Coulter, Krefeld
Ultrazentrifugenrotor	SW 41 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Volt-Ohm-Meter	<i>Millicell®-ERS</i>	Millipore, Billerica, USA
Vortex-Mixer	<i>Stuart SA8</i>	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Wasseraufbereitungsanlage	arium® pro VF	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	<i>Model 5510</i> W12D	Branson Ultrasonics, Danbury, USA Offenburg

##### Zellkultur

Hämozytometer	Neubauer <i>Improved</i>	Marienfeld, Lauda
Inkubator	BBD 6220 Cytoperm® 2	Thermo Fisher Scientific, Ulm Thermo Fisher Scientific, Ulm
Mikroskop	<i>Axiovert S100</i>	Carl Zeiss, Jena
Sicherheitswerkbank	<i>HERAsafe® HS 18</i> <i>Safe 2020</i>	Thermo Fisher Scientific, Ulm Thermo Fisher Scientific, Ulm
Tischzentrifuge	Biofuge® Primo R	Thermo Fisher Scientific, Ulm

##### Isolation proximaler Tubuluszellen

Chirurgische Instrumente	Anatomische Pinzette, gebogen	Aesculap, Tuttlingen
	<i>Bulldog</i> -Klemmen	Aesculap, Tuttlingen
	Chirurgische Pinzette, gerade	Aesculap, Tuttlingen
	Chirurgische Schere, gerade	Aesculap, Tuttlingen
	Mikro-Gefäßschere, gerade	Aesculap, Tuttlingen
Peristaltische Pumpe	Präparierschere, gerade	Aesculap, Tuttlingen
	MINIPULS® 2	Gilson, Middleton, USA

**PCR**

Filterabzug	<i>Captair® Chem Powdercap 821</i>	Camlab, Cambridge, UK
Gelelektrophoresesystem	Compact M	Biometra, Göttingen
<i>Power Supply</i>	<i>Standard Power Pack P25 T</i>	Biometra, Göttingen
<i>Real-Time PCR Cycler</i>	<i>Step One Plus™</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Thermocycler</i>	<i>DNA Engine®</i>	Bio-Rad, München
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	<i>5417 R Centrifuge</i>	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator	E-BOX™ Modell 1000	peqlab, Erlangen
UV/Vis-Spektrophotometer	<i>NanoDrop™ 2000c</i>	peqlab, Erlangen

**LDS-PAGE/Western Blot**

<i>Blot-Kammer</i>	<i>XCell SureLock™ Mini-Cell, XCell II Blot Module</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Elektrophoresekammer	<i>XCell SureLock™ Mini-Cell</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Molecular Imager</i>	<i>ChemiDoc™ XRS</i>	Bio-Rad, München
<i>Power Supply</i>	<i>PowerEase® 500</i>	Invitrogen, Karlsruhe

**Immunfluoreszenz**

CCD-Kamera	<i>AxioCam MRm</i>	Carl Zeiss, Jena
Feuchtkammer		Feinwerkstatt, Bayer Pharma, Berlin
Fluoreszenzmikroskop	<i>Axiovert 200</i>	Carl Zeiss, Jena

**1.5.2 Gerätesoftware**

<i>Axiovert 200/AxioCam MRm</i>	<i>AxioVision Rel. 4.8</i>	Carl Zeiss, Jena
<i>ChemiDoc™ XRS</i>	<i>Quantity One 4.6</i>	Bio-Rad, München
GENios™	Magellan 6.6	Tecan, Crailsheim
<i>Step One Plus™</i>	<i>StepOne™ Software v2.2.2</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Tri-Carb® 2900TR</i>	<i>Quantasmart 2.03</i>	PerkinElmer, Rodgau
<i>Wallac 1420 Multilabel Counter</i>	<i>Wallac 1420 Workstation 3.00</i>	PerkinElmer, Rodgau

**1.5.3 Verbrauchsmaterialien****Allgemein**

Combitips	10 ml, 20 ml, <i>Combitips advanced®</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>Multiwell-Platten</i>	96-Loch, <i>Primaria™</i>	BD, Heidelberg
Pasteurpipetten	150 mm, 300 mm	Wilhelm Ulbrich, Mainz
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl, epT.IPS	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, <i>Safe-Lock™</i>	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, <i>Stripette®</i>	Corning, Wiesbaden
Szintillationsröhrchen	6 ml, <i>Pony Vial</i>	PerkinElmer, Rodgau
Ultrazentrifugenröhrchen	14 × 89 mm, <i>Ultra-Clear™ Tube</i>	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Corning, Wiesbaden

**Zellkultur**

Kryoröhrchen	1,8 ml, <i>Nunc® CryoTubes®</i>	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Sterilfilter	50 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, <i>Nalgene Rapid Flow</i>	Thermo Fisher Scientific, Ulm
	12 mm, Porengröße 0,4 µM,	Corning, Wiesbaden
<i>Transwell®</i> Inserts	PET-Membran, Polystyren	

Zellkulturflaschen	75 cm <sup>2</sup> , 162 cm <sup>2</sup> , <i>Costar</i> <sup>®</sup> , Polystyren	Corning, Wiesbaden
Zellkulturplatten	12-Loch, 24-Loch, 48-Loch, <i>Costar</i> <sup>®</sup> , Polystyren	Corning, Wiesbaden
Zellschaber	32 cm	Thermo Fisher Scientific, Ulm
<b>Isolation proximaler Tubuluszellen</b>		
Einmalkanülen	22 G × 1" (0,9 × 25 mm), Vasocan <sup>®</sup> 23 G × 1" (0,6 × 25 mm), Sterican <sup>®</sup>	B. Braun, Melsungen B. Braun, Melsungen
Einmalspritzen	1 ml	Codan, Lensahn
Petrischalen	100 × 200 mm, Primaria <sup>™</sup>	BD, Heidelberg
Zellsiebe	70 µM, 100 µM, <i>Cell strainer, Nylon Mesh</i>	Thermo Fisher Scientific, Ulm
<b>PCR</b>		
Dekontaminationslösung	<i>DNA-ExitusPlus</i> <sup>™</sup> <i>Rnase Zap</i> <sup>®</sup>	AppliChem, Darmstadt Sigma-Aldrich, München
Homogenisator	<i>QIAshredder</i>	Qiagen, Hilden
PCR-Platten	96-Loch, <i>Thermo-Fast</i> <sup>®</sup>	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl, <i>SafeSeal-Tips</i> <sup>™</sup> professional	Biozym, Hessisch Oldendorf
Plattenabdeckfolie	<i>Adhesive PCR Film Seal</i>	Thermo Fisher Scientific, Ulm
<b>LDS-PAGE/Western Blot</b>		
Elektrophorese-Fertiggele	<i>NuPAGE</i> <sup>®</sup> 4–12 % Bis Tris	Invitrogen, Karlsruhe
Filterpapier	<i>Chromatography Paper</i> 3MM Chr	Whatman, Dassel
Transfermembran	0,45 µm, <i>Protran Nitrocellulose</i>	Whatman, Dassel
<b>Immunfluoreszenz</b>		
Kammer-Objektträger	8-Loch, Nunc <sup>®</sup> <i>Lab-Tek</i> <sup>®</sup> <i>Chamber Slides</i> <sup>™</sup>	Thermo Fisher Scientific, Ulm

#### 1.5.4 Chemikalien

Alle nicht näher spezifizierten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (München), Carl Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen und entsprachen mindestens dem Reinheitsgrad „zur Analyse“.

##### Verschiedenes

Aqua-Poly/Mount	Polysciences, Eppelheim
Biofluor Plus	PerkinElmer, Rodgau
Rattenschwanz-Kollagen (Typ 1)	BD, Heidelberg
Kollagenase (Typ 2)	Worthington, Lakewood, USA
<i>Complete</i> <sup>™</sup> <i>EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail</i>	Roche, Grenzach-Wyhlen, CH
Eserum	Jackson, Suffolk, UK
HBSS ([-]Ca <sup>2+</sup> , [-]Mg <sup>2+</sup> )	Life Technologies, Darmstadt
HBSS ([+]Ca <sup>2+</sup> , [+]Mg <sup>2+</sup> )	Life Technologies, Darmstadt
Heparin-Natrium (25.000 IE)	ratiopharm, Ulm
Ketavet (100 mg/ml)	Pfizer, Berlin
Opti-MEM <sup>®</sup>	Life Technologies, Darmstadt
PBS ([-]Ca <sup>2+</sup> , [-]Mg <sup>2+</sup> )	Life Technologies, Darmstadt
PBS ([+]Ca <sup>2+</sup> , [+]Mg <sup>2+</sup> )	Life Technologies, Darmstadt
Rompun (2 %)	Bayer, Leverkusen

**PCR**

Agarose	Bio-Rad, München
Ethidiumbromid	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Ladepuffer VIII	AppliChem, Darmstadt
<i>RiboRuler™ High Range RNA Marker</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
TAE-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
TBE-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP Set (100mM)	Invitrogen, Karlsruhe
dUTP (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Uracil-DNA Glykosylase (1 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>GoTaq® DNA Polymerase</i>	Promega, Mannheim
<i>5× Green GoTaq® Reaction Buffer</i>	Promega, Mannheim
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Thermo Fisher Scientific, Ulm

**LDS-PAGE/Western Blot**

<i>NuPAGE® LDS Sample Buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>NuPAGE® Reducing Agent</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>NuPAGE® Transfer Buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>NuPAGE® Antioxidant</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Magic Mark™ XP Western Protein Standard</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>SeeBlue® Plus2 Prestained Protein Standard</i>	Invitrogen, Karlsruhe

**2.1.1.1. Radioaktiv markierte Substanzen**

[ <sup>3</sup> H]-PAH	37,0 MBq/ml	168,72 GBq/mmol	PerkinElmer, Rodgau
[ <sup>3</sup> H]-MPP+	37,0 MBq/ml	3040,00 GBq/mmol	PerkinElmer, Rodgau
[ <sup>3</sup> H]-Clonidin	37,0 MBq/ml	2268,00 GBq/mmol	PerkinElmer, Rodgau
[ <sup>14</sup> C]-Mannitol	3,7 MBq/ml	2,18 GBq/mmol	PerkinElmer, Rodgau
[ <sup>14</sup> C]-TEA	3,7 MBq/ml	0,13 GBq/mmol	PerkinElmer, Rodgau

**2.1.1.2. Medien, Medienzusätze und sonstige Lösungen für die Zellkultur****Medien**

DMEM ([+] 25 mM Glucose,[ +]Phenolrot)	Life Technologies, Darmstadt
DMEM/F-12 ([+] 17,5 mM Glucose,[ -]Phenolrot)	Life Technologies, Darmstadt
McCoy's 5A ([+] 16,7 mM Glucose,[ +]Phenolrot)	Life Technologies, Darmstadt

**Medienzusätze**

FCS	Life Technologies, Darmstadt
GlutaMAX™ (L-Alanyl-L-Glutamin)	Life Technologies, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (10.000 μg/ml)	Life Technologies, Darmstadt
ITS-G (100×)	Life Technologies, Darmstadt
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin

**Sonstiges**

Trypsin-EDTA (0,25 %)	Life Technologies, Darmstadt
-----------------------	------------------------------

### 1.5.5 Fertigkits

<i>BCA™ Protein Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Ulm
<i>Hepatocyte Transporter Suspension Assay Kit</i>	BD, Heidelberg
<i>QuantiTect® Reverse Transcription Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QuantiTect® SYBR® Green Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy® Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNase-Free DNase Set</i>	Qiagen, Hilden
<i>Western Lightning® Plus-ECL</i>	PerkinElmer, Rodgau

### 1.5.6 Puffer und Verbrauchslösungen

#### 1.5.6.1 Isolation proximaler Tubuluszellen aus der Ratte

##### Hanks-HEPES-Puffer (10×)

NaCl	1370,0 mM	40,032 g
KCl	50,0 mM	1,864 g
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	8,0 mM	0,986 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	3,3 mM	0,294 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,4 mM	0,300 g
NaHCO <sub>3</sub>	260,0 mM	10,922 g
HEPES	250,0 mM	29,788 g
ddH <sub>2</sub> O		ad 500 ml
		pH 7,4

sterilfiltrieren

##### EGTA-Lösung (50×)

EGTA	25 mM	0,476 g
ddH <sub>2</sub> O		ad 50 ml

zum Lösen NaOH (1 M) zugeben

sterilfiltrieren

##### BSA-Puffer

BSA	2,5 % (w/v)	2,5 g
CaCl <sub>2</sub> (0,5 M)*	1,8 mM	360 µl
Hanks-HEPES-Puffer (1×)		100 ml

\*frisch dazugeben

##### Kollagenase-Lösung

Kollagenase (Typ 2)		40,0 mg
CaCl <sub>2</sub> (0,5 M)*	4,0 mM	240 µl
Hanks-HEPES-Puffer (1×)		30 ml

\*frisch dazugeben

#### 1.5.6.2 Isolation proximaler Tubuluszellen aus dem Affen

##### Kollagenase-Lösung

Kollagenase (Typ 2)	2 mg/ml	40,0 mg
HBSS ([+]Ca <sup>2+</sup> , [+]Mg <sup>2+</sup> )		ad 20 ml

**1.5.6.3 Kollagen-Beschichtung****Rattenschwanz-Kollagen-Lösung**

Kollagen (Typ 1) (3,32 mg/ml)	20 µg/ml	300 µl
Essigsäure (0,02 N)		ad 50 ml

**1.5.6.4 PCR****RNA-Agarose-Gel (2 %)**

Agarose	2 % (w/v)	2,0 g
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	0,5 µg/ml	5,0 µl

TBE-Puffer ad 100 ml

**DNA-Agarose-Gel (2 %)**

Agarose	2 % (w/v)	2,0 g
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	0,5 µg/ml	5,0 µl
TAE-Puffer		ad 100 ml

**PCR-Reaktionsansatz**

5× Green GoTaq® Reaction Buffer		5,000 µl
GoTaq® DNA Polymerase (5 U/µl)		0,125 µl
dNTPs (dCTP, dATP, dGTP) (10 mM)		je 0,500 µl
dUTP (10 mM)		0,440 µl
dTTP (1 mM)		0,625 µl
Forward Primer (25 pmol/µl)		0,500 µl
Reverse Primer (25 pmol/µl)		0,500 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)		3,000 µl
Uracil-N-Glykosylase (1 U/µl)		0,250 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O		12,560 µl
cDNA		0,500 µl

**qPCR-Reaktionsansatz**

2× QuantiTect® SYBR® Green PCR Mastermix		10,0 µl
Forward Primer (25 pmol/µl)		0,22 µl
Reverse Primer (25 pmol/µl)		0,22 µl
Uracil-N-Glykosylase (1 U/µl)		0,20 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O		7,36 µl
cDNA		2,00 µl

**1.5.6.5 Proteinisolation****RIPA-Puffer**

NaCl	150 mM	4,38 g
Tris-Base	50 mM	3,03 g
Natriumdesoxycholat	0,5 % (w/v)	2,5 g
SDS	0,1 % (w/v)	0,5 g
Triton X-100	1,0 % (v/v)	5 ml
ddH <sub>2</sub> O		ad 500 ml
		pH 8,0

**1.5.6.6 LDS-PAGE/Western Blot****Probenpuffer (1×)**

NuPAGE® LDS Sample Buffer (4×)		250 µl
NuPAGE® Reducing Agent (10×)		100 µl
ddH <sub>2</sub> O		650 µl

**Transferpuffer (1×)**

NuPAGE® Transfer Buffer (20×)		40 ml
NuPAGE® Antioxidant		800 µl
MeOH*		80 ml
ddH <sub>2</sub> O		680 ml

\*für 2 Gele/Blot-Modul: 160 ml MeOH + 600 ml ddH<sub>2</sub>O

**Blockpuffer**

BSA	5 % (w/v)	2,0 g
TBS-T		40 ml

**TBS (10×)**

NaCl	1500 mM	24,0 g
Tris-HCl	152 mM	5,6 g
Tris-Base	46 mM	88,0 g
ddH <sub>2</sub> O		ad 1000 ml
		pH 7,6

**TBS-T**

Tween 20	1 % (v/v)	1 ml
TBS (1×)		100 ml
ddH <sub>2</sub> O		900 ml

**Stripping-Puffer**

Tris-HCl	62,5 mM	1,0 g
2-Mercaptoethanol*	100 mM	
SDS	2 % (w/v)	2,0 g
ddH <sub>2</sub> O		ad 100 ml
		pH 6,7

\*frisch zugeben: 160 µl in 20 ml Stripping-Puffer

**Amido Black-Lösung**

Amido Black	0,1 % (w/v)	0,1 g
MeOH	20,0 % (v/v)	20,0 ml
Essigsäure (100 %)	7,5 % (v/v)	7,5 ml
ddH <sub>2</sub> O		72,5 ml

**Entfärbelösung**

MeOH	20,0 % (v/v)	100,0 ml
Essigsäure (100 %)	7,5 % (v/v)	37,5 ml
ddH <sub>2</sub> O		362,5 ml

**1.5.6.7 Immunfluoreszenz****TBS (10×)**

NaCl	1500 mM	90,0 g
Tris-HCl	160 mM	132,2 g
Tris-Base	840 mM	19,4 g
ddH <sub>2</sub> O		ad 1000 ml

**IF-Puffer**

Triton X-100	0,1 % (v/v)	
Eselserum	3 % (v/v)	
TBS		

**1.5.6.8 Bestimmung der Enzymaktivität von  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 (GGT1)****Tris-Glycylglycin-Puffer**

Tris-Base	133,3 mM	1,62 g
Glycylglycin	88,9 mM	1,17 g
ddH <sub>2</sub> O		ad 100 ml
		pH 8,5

**GPNA-Lösung**

GPNA	60 mM	16,0 mg
HCl (0,5 M)		1,0 ml

**Arbeitslösung**

GPNA-Lösung		1,0 ml
Tris-Glycylglycin-Puffer		9,0 ml

**1.5.6.9 Transportstudien****Transportpuffer**

NaCl	128,0 mM	7,49 g
KCl	5,4 mM	0,40 g
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	1,0 mM	0,23 g
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	1,8 mM	0,26 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	1,2 mM	0,32 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,4 mM	0,06 g
HEPES	15,0 mM	3,58 g
Glucose	20,0 mM	3,97 g
NaHCO <sub>3</sub>	4,2 mM	0,35 g
ddH <sub>2</sub> O		ad 1000 ml
		pH 7,2

**Lysepuffer**

SDS	1 % (w/v)	1 g
NaOH (1 M)	0,1 %	100 $\mu$ l
PBS		ad 100 ml

### 1.5.7 Antikörper

Tabelle 2-1: Übersicht über die für *Western Blot* und Immunfluoreszenz verwendeten Primärantikörper.

Spezifität	Klon	Typ	Wirt	Reaktivität*	Hersteller
<b>Occludin</b>	Z-T22	pAb	Kaninchen	Hu, Ms, Rt, Hd	Invitrogen, Karlsruhe
<b>TJP1</b>	Z-R1	pAb	Kaninchen	Hu, Ms, Rt, Hd	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Claudin-2</b>	12H12	mAb	Maus	Hu, Ms, Rt, Hd	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Claudin-7</b>	ZMD.241	pAb	Kaninchen	Hu, Ms, Hd	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Claudin-10</b>	4B8A12	mAb	Maus	Hu†, Ms, Rt†	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Villin</b>	H-60	pAb	Kaninchen	Hu, Ms, Rt	Santa Cruz, Santa Cruz, USA

pAb: *Polyclonal Antibody*, mAb: *Monoclonal Antibody*, Hu: Human, Ms: Maus, Rt: Ratte, Hd: Hund, \*laut Hersteller, †erwartet

Tabelle 2-2: Übersicht über die für *Western Blot* und Immunfluoreszenz verwendeten Sekundärantikörper.

Spezifität	Wirt	Fluorophor	Enzym	Verdünnung	Hersteller
<b>Kaninchen-IgG</b>	Esel	Cy3	-	1:100	Jackson, Suffolk, UK
<b>Maus-IgG</b>	Esel	Cy3	-	1:100	Jackson, Suffolk, UK
<b>Kaninchen-IgG</b>	Ziege	-	HRP	1:5000	Sigma-Aldrich, München

IgG: Immunglobulin G, Cy3: Cyanin 3, HRP: Horseradish peroxidase. \*für Immunfluoreszenz

### 1.5.8 Primer

Für die Expressionsanalyse von humanem GAPDH wurde der *QuantiTect® Primer Assay* Hs\_GAPDH\_1\_SG von Qiagen (Hilden) verwendet. Für alle weiteren untersuchten Gene wurden zunächst geeignete Primer mittels Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) entworfen. Dabei wurden die folgenden Kriterien berücksichtigt. Die Primer wurden so gewählt, dass das Amplikon eine Länge von 80–200 bp hat. Die Länge der Primer sollte zwischen 18–30 bp liegen und sie sollten einen GC-Gehalt von 40–60 % aufweisen. Der Schmelzpunkt ( $T_m$ ) sollte 55–60 °C betragen und die Differenz der Schmelzpunkte eines Primerpaares ( $\Delta T_m$ ) sollte kleiner als 3 °C sein. Die letzte Base sollte nach Möglichkeit ein Guanin oder Cytosin sein. Außerdem wurde darauf geachtet, dass keine *Mismatches* zwischen Primer und *Template* vorhanden sind. Um Sekundärstrukturen wie *Hairpins* zu vermeiden sollte keine Komplementarität innerhalb eines Primers bestehen und zur Vermeidung der Bildung von Primer-*Dimern* sollten die Sequenzen der Primerpaare auch nicht gegenseitig komplementär sein. Durch das Überspringen von Intron-Sequenzen (*Intron spanning*) wurde gewährleistet, dass nur mRNA und keine eventuell noch vorhandene genomische DNA als *Template* dienen kann. Die Synthese aller Primer erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg). Eine Übersicht über die verwendeten Primer und deren Sequenzen ist Tabelle 2-3 (Primer für *Rattus norvegicus*) sowie Tabelle 2-4 (Primer für *Homo sapiens*) zu entnehmen.

Tabelle 2-3: Übersicht über die in der PCR und qPCR verwendeten Primer für *Rattus norvegicus*

Gen	Accession Number (RefSeq)	Primersequenz		Amplikon (bp)
<b>Abcb1a</b>	NM_133401.1	<i>forward</i>	5'-CATCTTGGCGGACCTTACGGAGG-3'	183
		<i>reverse</i>	5'-ACCTGCATAGCGAAACATTGTGAGC-3'	
<b>Abcc2</b>	NM_012833.1	<i>forward</i>	5'-GCGCCCTGGGTGACTGACAAG-3'	166
		<i>reverse</i>	5'-CAGTCCTGCCACTACGCCG-3'	
<b>Abcc4</b>	NM_133411.1	<i>forward</i>	5'-ACAGCTTACGGCTACGCGGC-3'	181
		<i>reverse</i>	5'-GGCCCGTGGTTGTCTTCCCC-3'	
<b>Abcg2</b>	NM_181381.2	<i>forward</i>	5'-AGGCGGAGGCAAGTCTTCGTTG-3'	103
		<i>reverse</i>	5'-ATTGGCAGGTTGAGGTGCC-3'	
<b>Alpl</b>	NM_013059.1	<i>forward</i>	5'-GTGGAAGGAGGCAGGATTGACCAC-3'	116
		<i>reverse</i>	5'-TTCTGGGAAGTCATGGTGCCCG-3'	
<b>Anpep</b>	NM_031012.1	<i>forward</i>	5'-TCTGCCGCTGAGCAACACCC-3'	135
		<i>reverse</i>	5'-AGATAGCGCTTCATGGGGCCG-3'	
<b>Cldn10</b>	NM_001106058.1	<i>forward</i>	5'-TGTTCCATGACGGGCTGTTCC-3'	96
		<i>reverse</i>	5'-GGCAGCCCCAATTCATACTTTTGC-3'	
<b>Cldn11</b>	NM_053457.2	<i>forward</i>	5'-TTCTCCCCTGTATCCGAATG-3'	157
		<i>reverse</i>	5'-AAGCTCACGATGGTGATCTC-3'	
<b>Cldn2</b>	NM_001106846.2	<i>forward</i>	5'-AGAACAGCTCCGTTTTCTAGATGCC-3'	160
		<i>reverse</i>	5'-TGTTGCTTGTCTTTGGCTGCG-3'	
<b>Cldn7</b>	NM_031702.1	<i>forward</i>	5'-TGGCCATGTTTGTGCGCCACGATG-3'	126
		<i>reverse</i>	5'-CCAAAGCAGCAAGACCTGCCACG-3'	
<b>Gapdh</b>	NM_017008.3	<i>forward</i>	5'-ATCTTCTTGTGCAGTGCCAGCCTCG-3'	115
		<i>reverse</i>	5'-ACTTTGTCACAAGAGAAGGCAGCCC-3'	
<b>Ggt1</b>	NM_053840.2	<i>forward</i>	5'-TGAGCTGGCACACCAACGGC-3'	169
		<i>reverse</i>	5'-CCGGCAGAACACCTCGCACA-3'	
<b>Hk1</b>	NM_012734.1	<i>forward</i>	5'-ACACCTGCTTTCCGCATCCCC-3'	124
		<i>reverse</i>	5'-AGCCGCATGGCGTACAGATAC-3'	
<b>Ocln</b>	NM_031329.2	<i>forward</i>	5'-CGCCTCTGGTACCTGAAGTAGCCC-3'	159
		<i>reverse</i>	5'-GGTCTGGGTCTGTCTCTTCGCC-3'	
<b>Slc15a1</b>	NM_001079838.1	<i>forward</i>	5'-TCTCTGCCTCTCTCACTTGCC-3'	166
		<i>reverse</i>	5'-TGTGACAGAGAAGACCACCTCGCC-3'	
<b>Slc15a2</b>	NM_031672.1	<i>forward</i>	5'-AAGAGGAACATGCAGAGGCACGG-3'	81
		<i>reverse</i>	5'-ACGTGGAAATCAAGCTCCCCGC-3'	
<b>Slc22a1</b>	NM_012697.1	<i>forward</i>	5'-GCTGATGGAAGTTTGCAAGCCC-3'	158
		<i>reverse</i>	5'-TGGCCTTTGATTTCTCTCCCC-3'	
<b>Slc22a12</b>	NM_001034943.1	<i>forward</i>	5'-AGGAACCGAACGGGAACCAAGC-3'	107
		<i>reverse</i>	5'-GCCAAAGGCAAACCAGCACAGC-3'	
<b>Slc22a2</b>	NM_031584.1	<i>forward</i>	5'-ACTGGTTGTATTTGCTGTGGTTGGC-3'	120
		<i>reverse</i>	5'-CTTGGCCTCTGCATATTCTCGGC-3'	
<b>Slc22a24</b>	NM_173302.1	<i>forward</i>	5'-TACATGGGCGCAGAACCAACC-3'	99
		<i>reverse</i>	5'-ACGCGGGATCTGCATTTCTGAGTC-3'	
<b>Slc22a4</b>	NM_022270.1	<i>forward</i>	5'-AGGCGGGAAGCATGAGGGACTATG-3'	195
		<i>reverse</i>	5'-ACGCGCTGCTCAAGTTCACG-3'	
<b>Slc22a5</b>	NM_019269.1	<i>forward</i>	5'-TCCTGTGGCTGACCATATCAGTGGG-3'	132
		<i>reverse</i>	5'-ACAGCCAGGCCAACACATAGGC-3'	
<b>Slc22a6</b>	NM_017224.2	<i>forward</i>	5'-CCACAGTGATTCGGCAGACAGGC-3'	148
		<i>reverse</i>	5'-GCACTGGCGACCACAGGGAC-3'	
<b>Slc22a7</b>	NM_053537.2	<i>forward</i>	5'-GGCTGTTGCTGCCAAAGTTGC-3'	135
		<i>reverse</i>	5'-CCTCCTGGGTA CTCTCTCTCCAC-3'	
<b>Slc22a8</b>	NM_031332.1	<i>forward</i>	5'-TTCCAATGACACCCAGAGGGC-3'	101

		<i>reverse</i>	5'-GCTGCACACCAAGTCCCCTCTATC-3'	
<b><i>Slc47a1</i></b>	NM_001014118.2	<i>forward</i>	5'-CAGTCTCTGAGTGGTATCCTTGGC-3'	139
		<i>reverse</i>	5'-TGCACCCAACGCATTTCCCACC-3'	
<b><i>Slco1a1</i></b>	NM_017111.1	<i>forward</i>	5'-GATGTGTGATTATGGGCTGGGG-3'	157
		<i>reverse</i>	5'-TGCCTTGGCTTAAGGTCTGTGTTC-3'	
<b><i>Slco1a3</i></b>	NM_030837.1	<i>forward</i>	5'-CACTACCTCATTTCTCATGGGCCG-3'	139
		<i>reverse</i>	5'-ACACACTCTGCTGGGTCTTGCG-3'	
<b><i>Slco4c1</i></b>	NM_001002024.1	<i>forward</i>	5'-CCACGGGATTTGCCACGTTTTTACC-3'	89
		<i>reverse</i>	5'-AACAGCCCCTCCAAGTGTGCC-3'	
<b><i>Tjp1</i></b>	NM_001106266.1	<i>forward</i>	5'-TTCAGTTCGCTCCCATGACAGGC-3'	132
		<i>reverse</i>	5'-TCCTCTCTGCTCCGGAGACTGCC-3'	
<b><i>Vil1</i></b>	NM_001108224.2	<i>forward</i>	5'-TGCCCAATCGGACCTCAGGC-3'	161
		<i>reverse</i>	5'-GCGCCACACCTGCACTTCCC-3'	

Tabelle 2-4: Übersicht über die in der PCR und qPCR verwendeten Primer für *Homo sapiens*

Gen	Accession Number (RefSeq)	Primersequenz		Amplikon (bp)
<b><i>ABCB1</i></b>	NM_000927.4	<i>forward</i>	5'-CTCTTTGCCACAGGAAGCCTGAGC-3'	175
		<i>reverse</i>	5'-CTTCAAGATCCATTCCGACCTCGC-3'	
<b><i>ABCC2</i></b>	NM_000392.3	<i>forward</i>	5'-AACGCACATGAAGAGAGAGCTGC-3'	151
		<i>reverse</i>	5'-TTCAACATCTTCCAGGACAAGGGC-3'	
<b><i>ABCC4</i></b>	NM_001105515.1	<i>forward</i>	5'-ACTTCAGAGCTGGTGTCTACTGG-3'	111
		<i>reverse</i>	5'-TGTTTGCCAGTATGAAAGCCACC-3'	
<b><i>ABCG2</i></b>	NM_001257386.1	<i>forward</i>	5'-CGATATGGATTTACGGCTTTCAGC-3'	191
		<i>reverse</i>	5'-ACAATCATAACAAGCCAAGGCCACG-3'	
<b><i>ALPL</i></b>	NM_000478.4	<i>forward</i>	5'-CAGGGATAAAGCAGGTCTTGGG-3'	102
		<i>reverse</i>	5'-CTTCTCTTTCTCTGGCACTAAGG-3'	
<b><i>ANPEP</i></b>	NM_001150.2	<i>forward</i>	5'-ACAGCCAGTATGAGATGGACAGC-3'	104
		<i>reverse</i>	5'-CACCACCTTTCTGACATTGCCC-3'	
<b><i>CLDN10</i></b>	NM_182848.3	<i>forward</i>	5'-TATTCATACTGTGAGGGCTGTGC-3'	135
		<i>reverse</i>	5'-CTGCCATCCAATAAACAGAGCG-3'	
<b><i>CLDN11</i></b>	NM_005602.5	<i>forward</i>	5'-CTGACTGTTCTTCCCTGCATCC-3'	101
		<i>reverse</i>	5'-CAGAGAGCCAGCAGAATGAGC-3'	
<b><i>CLDN2</i></b>	NM_001171092.1	<i>forward</i>	5'-TGGGAAGGCTAGGGAGTCAAAGGG-3'	197
		<i>reverse</i>	5'-TAGAAGACCTGAATGGCCTGTGAGC-3'	
<b><i>CLDN7</i></b>	NM_001185022.1	<i>forward</i>	5'-GGACAGTGGGTGCGCCGAGAGC-3'	182
		<i>reverse</i>	5'-AAGGGTTGGGCCAGGTGAATGC-3'	
<b><i>GAPDH</i></b>	NM_001256799	unbekannt*		95
	NM_002046	unbekannt*		95
<b><i>GGT1</i></b>	NM_001032364.2	<i>forward</i>	5'-CCCAGAAGTGAGAGCAGTTGG-3'	95
		<i>reverse</i>	5'-CTGCACCCGCTATGATGTCC-3'	
<b><i>HK1</i></b>	NM_000188.2	<i>forward</i>	5'-CAGATCGAGAGTGACCGATTAGC-3'	170
		<i>reverse</i>	5'-ATCTTATCCACAACCGCAGCC-3'	
<b><i>OCLN</i></b>	NM_001205254.1	<i>forward</i>	5'-AGTTGCGGCGAGCGGATTGG-3'	113
		<i>reverse</i>	5'-AGGTGGACTTTCAAGAGGCCTGG-3'	
<b><i>SLC15A1</i></b>	NM_005073.3	<i>forward</i>	5'-ATGAAGTCGGTGCTTCAGGCAGG-3'	111
		<i>reverse</i>	5'-AATGTACTCGGCCACTGTTTGC-3'	
<b><i>SLC15A2</i></b>	NM_001145998.1	<i>forward</i>	5'-AGCCATCTCCGACAATCTGTGGC-3'	186
		<i>reverse</i>	5'-AACAGAGGCTGCTGAAGGCATGG-3'	
<b><i>SLC22A1</i></b>	NM_003057.2	<i>forward</i>	5'-CCACATTCGTCAGGAACCTCGG-3'	170
		<i>reverse</i>	5'-TGGAAGAAGTAGCGTCACTCCCG-3'	

<b>SLC22A12</b>	NM_144585.2	<i>forward</i>	5'-ATCTCCACGTTGTGCTGGTTCCGC-3'	129
		<i>reverse</i>	5'-CATCTGGCTGGGATGTCCACG-3'	
<b>SLC22A2</b>	NM_003058.3	<i>forward</i>	5'-TAGCAGACAGGTTTGGCCGTAAGC-3'	144
		<i>reverse</i>	5'-AGCCTGCTTTGCTGACCAGTCC-3'	
<b>SLC22A4</b>	NM_003059.2	<i>forward</i>	5'-TCCATTGGTCTGGTCATGCTGGG-3'	188
		<i>reverse</i>	5'-AGCATTCTGTTGTAAGCACCGAGG-3'	
<b>SLC22A5</b>	NM_003060.3	<i>forward</i>	5'-GCCAATGGGATTGTTGTGCCTTCC-3'	165
		<i>reverse</i>	5'-GCCCACTGATATGGTCATCCACAGC-3'	
<b>SLC22A6</b>	NM_004790.4	<i>forward</i>	5'-CATCTACGGTGCTGTTCTGTGGC-3'	158
		<i>reverse</i>	5'-GCGTCTGTTTCCCTTCTGGG-3'	
<b>SLC22A7</b>	NM_006672.3	<i>forward</i>	5'-TAGCTGTACCCTGCCTTGTGC-3'	181
		<i>reverse</i>	5'-ACTTTGCTCACAGCCTCCTGGC-3'	
<b>SLC22A8</b>	NM_001184732.1	<i>forward</i>	5'-AGAAAGGCTCAGCTTGGAGGAGC-3'	128
		<i>reverse</i>	5'-GGGAAAGACAGAAGGTCATGCGGC-3'	
<b>SLC22A9</b>	NM_080866.2	<i>forward</i>	5'-CCGAGTGGGCAACACAGATTCC-3'	183
		<i>reverse</i>	5'-CAGACTCTAGCAGCCAACCTTGAGG-3'	
<b>SLC47A1</b>	NM_018242.2	<i>forward</i>	5'-AGCTTCCTCAGTGGCATCCTCG-3'	138
		<i>reverse</i>	5'-AGCACCCAGAGCGTTTCTACC-3'	
<b>SLC47A2</b>	NM_001099646.1	<i>forward</i>	5'-CGGTGGCCTTTGTCAATGTCTGC-3'	190
		<i>reverse</i>	5'-ATGTGCTGGGTGTTGAGGAAGAGC-3'	
<b>SLCO4C1</b>	NM_180991.4	<i>forward</i>	5'-ACTGTCGCTGTCCGAGTTTGAGG-3'	135
		<i>reverse</i>	5'-ACTACAATACCTTGCCTGACGGC-3'	
<b>TJP1</b>	NM_003257.3	<i>forward</i>	5'-TGCCATTACCGGTCCTCTGAGC-3'	155
		<i>reverse</i>	5'-CTGCTTCTGTTGAGAGGCTGGC-3'	
<b>VIL1</b>	NM_007127.2	<i>forward</i>	5'-CATTGTGGTGAAGCAGGGACACG-3'	154
		<i>reverse</i>	5'-TGTGACCTCAGCAGTGATCTGGC-3'	

\*Es wurde der QuantiTect® Primer Assay Hs\_GAPDH\_1\_SG (Qiagen, Hilden) verwendet

## 1.5.9 Zellkultur

### 2.1.1.3. Zelllinien

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien findet sich in Tabelle 2-5. Die Zelllinie *Madin-Darby canine kidney II* (MDCKII) stammte aus dem Labor von Prof. Alfred Schinkel (*Netherlands Cancer Institute*, Amsterdam, NL). Es handelt sich dabei um eine etablierte Zelllinie die ursprünglich aus dem Nierenepithel eines weiblichen Cocker Spaniels (*Canis familiaris*) isoliert wurde (Gaush *et al.*, 1966). Bei den *Normal rat kidney-52E* (NRK-52E)-Zellen handelt es sich um Nierenepithelzellen aus der Ratte (*Rattus norvegicus*). Die Zellen wurden durch Infektion eines epithelialen Subklons der NRK-Zelllinie mit dem *Moloney sarcoma virus* transformiert (Huu Duc-Nguyen *et al.*, 1966; de Larco and Todaro, 1978). Bezogen wurde diese Zelllinie von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Weiterhin wurden zwei Zelllinien humanen Ursprungs verwendet. Die *Immortalized human kidney epithelial-1* (IHKE-1)-Zellen stammen aus dem Nierencortex humaner Föten und wurden durch kontinuierliche Behandlung mit NiSO<sub>4</sub> immortalisiert (Tveito *et al.*, 1989). Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Marc Gnoth (Bayer Pharma AG, Wuppertal) zur Verfügung gestellt. *Carcinoma kidney-1* (Caki-1)-Zellen wurden aus einem männlichen 49-jährigen Patienten mit Nierenkarzinom

(ICD-O: 8964/3, Klarzelliges Nierensarkom) gewonnen (Fogh *et al.*, 1977) und von der *American type culture collection* (ATCC) bezogen. Für einige Versuche wurden auch *Renal Proximal Tubule Epithelial Cells* (RPTECs) eingesetzt. Diese wurden durch Lonza BioResearch bezogen und sind kommerziell erhältliche Primärzellen aus humanen proximalen Tubuli.

Tabelle 2-5: Übersicht über die verwendeten immortalisierten Zelllinien und deren Herkunft

	Name	Herkunft
MDCKII	<i>Madin-Darby canine kidney II</i>	<i>Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, NL</i>
NRK-52E	<i>Normal rat kidney-52E</i>	DSMZ (ACC 199), Braunschweig
IHKE-1	<i>Immortalized human kidney epithelial-1</i>	Bayer Pharma AG, Wuppertal
Caki-1	<i>Carcinoma kidney-1</i>	ATCC (HTB-46), Manassas, VA, USA
RPTEC	<i>Renal proximal tubule epithelial cells</i>	Lonza BioResearch, Basel

#### 2.1.1.4. Zellkulturmedien

Tabelle 2-6: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien.

	MDCKII	NRK-52E	IHKE-1	Caki-1	PRPTC/PMPTC
DMEM	x	x	-	-	-
DMEM/F-12	-	-	x	-	x
McCoy's 5A	-	-	-	x	-
FCS	10 %	10 %	1 %	10 %	10 % / 0 %*
GlutaMAX™	2 mM	2 mM	4 mM	-	2 mM
Penicillin/Streptomycin	100 µg/ml				
ITS	-	-	1x	-	1x
Natriumpyruvat	-	-	1 mM	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	-	15 mM	-	-
HEPES	-	-	15 mM	-	-
Hydrocortison	-	-	36,0 µg/l	-	-
EGF	-	-	10,0 µg/l	-	-

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM/F-12: *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12*, FCS: *Fetal calf serum*, ITS: *Insulin-Transferrin-Selenium*, EGF: *Epidermal growth factor*. \*Initiale Konzentration 10 %, nach 24 h Wechsel zu serumfreiem Medium.

#### 1.5.10 Versuchstiere

Es wurden männliche Wistar Han-Ratten (RccHan:WIST, Harlan Laboratories, Rossdorf) mit einem durchschnittlichem Gewicht von  $270 \pm 35$  g verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte in transparenten Standardkunststoffkäfigen unter kontrollierten Bedingungen bei einer konstanten Raumtemperatur von 22 °C und einem 12-Stunden-Tag-Nachtrhythmus. Dabei hatten die Tiere freien Zugang zu pelletiertem Standardfutter (V1534-000 R/M-H, ssniff Spezialitäten, Soest) und Leitungswasser. Alle Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und genehmigt.

## 1.6 ZELLKULTURTECHNIKEN

### 1.6.1 Isolation und Kultivierung proximaler Tubuluszellen aus der Ratte

Zur Isolation von primären proximalen Tubuluszellen aus der Ratte (PRPTCs) wurde zunächst eine *In-situ*-Perfusion der Nieren durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurden 150 ml EGTA-Lösung (1×), 100 ml BSA-Puffer und 30 ml Kollagenase-Lösung frisch angesetzt und die EGTA- und Kollagenase-Lösung sowie 30 ml Hanks-HEPES-Puffer (1×) auf 37 °C und der BSA-Puffer auf 4 °C vortemperiert. Danach konnte mit der Isolation begonnen werden. Die Versuchstiere wurden dazu zunächst durch intraperitoneale Injektion von 0,1 ml/100 g Narkosemittel (Rompun 2 %, Ketavet 100 mg/ml, v/v 50/50) narkotisiert. Im Anschluss wurde im Operationsbereich das Fell entfernt und die Haut gründlich desinfiziert. Zur Vermeidung von Thromben wurde 1 ml Heparin-Natrium (25.000 IE) entweder intravenös in die Schwanzvene injiziert oder zur EGTA-Lösung hinzugegeben. Nach Überprüfen der Narkose (Lid-, Pedal-, und Schwanzreflex, sowie Atemfrequenz- und tiefe) wurde das Versuchstier fixiert und die Peritonealhöhle durch einen Medianschnitt vom Unterbauch bis zum Brustbein sowie zwei Querschnitte im Unterbauch eröffnet. Es wurde stets darauf geachtet, Haut und Fell vom Operationsbereich fern zu halten, um eine Kontamination zu vermeiden. Danach wurde die Leber durch Durchtrennung der Befestigungsbänder am Zwerchfell und an der hinteren Bauchwand mobilisiert und das Bauchpaket (Magen, Darm, Leber und Milz) stumpf zur linken Seite geschoben. Mit einer kleinen anatomischen Pinzette wurden daraufhin Faszien und Fett entfernt um die Aorta-Abgänge sichtbar zu machen. Der *Truncus coeliacus* und die *Arteria mesenterica superior* wurden ligiert und distal der Nierenarterien-Abgänge wurde eine lose Ligatur um die *Aorta abdominalis* gelegt. Nun wurde die Aorta bis zum Zwerchfell frei präpariert und oberhalb der Seitenabgänge eine weitere lose Ligatur gelegt. Nachdem nun möglichst zügig zuerst die untere und im Anschluss die obere Aorten-Ligatur verschlossen wurde, wurde die Aorta etwas distal der Nierenarterien mit einem Katheter (22 G × 1" (0,9 × 25 mm), Vasocan®) kanüliert und dieser mittels *Bulldog*-Klemme und einer weiteren Ligatur fixiert. Die Perfusion wurde mit 150 ml EGTA-Lösung mit einer Durchflussrate von 7,5 ml/min gestartet und die *Vena renalis sinister* inzidiert. Das EGTA dient dabei der Komplexbildung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen um die Zellverbände aufzulockern. Anschließend wurde das Bauchpaket entfernt und die Nieren vorsichtig freipräpariert und herausgelöst. Nachdem die Perfusion mit EGTA-Lösung beendet war, folgte eine Perfusion mit 30 ml Hanks-HEPES-Puffer um das Ca<sup>2+</sup> wieder zu entfernen, da dieses sich störend auf die Aktivität der Kollagenase auswirkt. Es fand nun eine rezirkulierende *Ex-situ*-Perfusion mit Kollagenase-Lösung für 20 min statt. Dazu wurde das Nierenpaket entnommen und über dem Becherglas mit der Kollagenase-Lösung fixiert. Nach Ende der Perfusion konnte mit der Aufreinigung der Tubuluszellen begonnen werden. Ab diesem Zeitpunkt fanden alle Schritte unter einer sterilen Arbeitsbank und auf Eis statt. Es wurde das Nierenpaket zunächst in eine Petrischale mit eiskaltem BSA-Puffer überführt und vorsichtig

Gefäßreste sowie Fett- und Bindegewebe mit Präparierpinzetten entfernt. Nach Überführen der Nieren in eine weitere Petrischale mit frischem BSA-Puffer wurde die Nierenkapsel, die das Nierenparenchym umschließt, entfernt und der Cortex durch vorsichtiges Abschaben mit einer Präparierpinzette von Medulla und Kelchsystem getrennt. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer serologischen Pipette wurde die Suspension homogenisiert. Die Suspension wurde daraufhin durch ein Nylon-Zellsieb mit einer Porengröße von 100  $\mu\text{m}$  filtriert und nach Ausspülen des Zellsiebs mit 10 ml BSA-Puffer durch ein weiteres Zellsieb mit 70  $\mu\text{m}$  Porengröße filtriert. Dieses wurde ebenfalls mit 10 ml frischem BSA-Puffer ausgespült und die Suspension im Anschluss für 3 min bei  $200 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskaltem PRPTC-Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 1.6.6). Für die Versuche mit frisch isolierten PRPTCs wurden die Zellen direkt weiterverwendet. Zur Kultivierung wurden sie auf zuvor mit Rattenschwanz-Kollagen (Typ 1) beschichtete Zellkulturflaschen oder Platten mit einer Aussaatdichte von  $4,0 \cdot 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$  ausgesät (siehe Kapitel 1.6.3). Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % relativer Feuchte, der Mediumwechsel erfolgte alle 1–2 Tage.

### 1.6.2 Isolation und Kultivierung proximaler Tubuluszellen aus dem Affen

Da im Falle der Isolation von proximalen Tubuluszellen aus dem Affen (PMPTCs) die Möglichkeit einer *In-situ*-Perfusion nicht gegeben war, erfolgte die Isolation durch einen *Ex-situ*-Kollagenase-Verdau nach einer leicht modifizierten Methode nach Gowder *et al.* (Gowder and McMartin, 2010). Die Nieren wurden im Verlauf einer Sektion durch die Abteilung Toxikologie der Bayer Pharma AG (Berlin) entnommen und in eiskaltem HBSS ( $[-]\text{Ca}^{2+}$ ,  $[-]\text{Mg}^{2+}$ ) entgegengenommen. Nach dem Wiegen erfolgte zunächst ein dreimaliges Waschen der Nieren mit eiskaltem HBSS in Zentrifugenröhrchen (50 ml). Im Anschluss wurde die Kapsel entfernt und die Nieren erneut dreimal in eiskaltem HBSS gewaschen. Dann wurden die Nieren in eine mit HBSS gefüllte Petrischale auf Eis überführt und in vier etwa gleich große Teile aufgeteilt. Von diesen wurde der Kortex abgekratzt und mit einem Skalpell so weit zerkleinert, dass etwa  $1 \text{ mm}^3$  kleine Stücke entstanden. Das HBSS wurde abgesaugt und die Kortexstücke durch Zentrifugation in PBS ( $[-]\text{Ca}^{2+}$ ,  $[-]\text{Mg}^{2+}$ ) für 2 min bei  $760 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  gewaschen (Qi *et al.*, 2007). Danach wurden die Kortexstücke in eine auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmte Trypsinierungsflasche überführt und unter leichtem Rühren mit einem Rührfisch für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  in 20 ml Kollagenase-Lösung inkubiert. Im Anschluss folgte ein Filtrieren der Suspension durch ein Zellsieb mit 100  $\mu\text{m}$  Porengröße. Nachdem das Filtrat in 10 ml eiskaltem HBSS ( $[+]\text{Ca}^{2+}$ ,  $[+]\text{Mg}^{2+}$ ) überführt wurde, folgte zum Abschluss eine Zentrifugation für 10 min bei  $228 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$ . Der Überstand wurde verworfen und die Zellen analog zu den PRPTCs ausgesät und kultiviert (siehe Kapitel 1.6.1) oder für die Proteinisolation weiterverwendet (siehe Kapitel 1.8.1).

### 1.6.3 Kollagen-Beschichtung

Zur Aussaat von PRPTCs und PMPTCs wurden alle verwendeten Zellkulturgefäße zuvor mit Rattenschwanz-Kollagen (Typ 1) beschichtet. Dazu wurde das Rattenschwanz-Kollagen zunächst in Essigsäure (0,02 N) mit einer Konzentration von 20 µg/ml gelöst (siehe Kapitel 1.5.6) und anschließend auf die zu beschichtenden Zellkulturgefäße gegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Kollagen-Lösung vorsichtig abgesaugt und die Gefäße zweimal mit PBS gewaschen. Die so beschichteten Gefäße wurden entweder direkt weiterverwendet oder bei 4 °C für maximal 2 Wochen aufbewahrt.

### 1.6.4 Kultivierung immortalisierter Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden einmal pro Woche, nach Erreichen einer ca. 90 %igen Konfluenz des Zell-Monolayers, passagiert. Dazu wurde der *Monolayer* in jeder Zellkulturflasche zunächst mit 10 ml PBS ([-]Ca<sup>2+</sup>, [-]Mg<sup>2+</sup>) gewaschen. Im Anschluss wurden 10 ml (162 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche) beziehungsweise 5 ml (75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche) Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %) zugegeben und die Zellkulturflaschen für ca. 5–10 min im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen begannen sich abzulösen. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Zellschabers (MDCKII- und NRK-52E-Zellen) beziehungsweise durch leichtes Klopfen (IHKE-1- und Caki-1-Zellen) vorsichtig vom Boden abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt. Um die Trypsin-Reaktion abzustoppen wurde die Lösung 1:1 (v/v) mit Kulturmedium vermischt, für 5 min bei 200 × g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 10 ml frischem Kulturmedium gründlich resuspendiert. Um das benötigte Volumen Zellsuspension zum Aussähen zu ermitteln, wurde die Zellzahl mit Hilfe eines Hämozytometers bestimmt (siehe Kapitel 1.6.6). Für die Stammkultivierung betrug die Aussaatdichte 1,25 · 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Feuchte, der Mediumwechsel erfolgte alle 1–2 Tage.

### 1.6.5 Kryokonservierung der Zellen

Zur Einfrieren wurde zunächst eine Zellsuspension durch Trypsinierung hergestellt (siehe Kapitel 1.6.4) und die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 1.6.6). Die Zellen wurden dann bei 200 × g für 10 min bei Raumtemperatur pelletiert und das Kulturmedium abgesaugt. Zur Einstellung der gewünschten Zellzahl wurde das benötigte Volumen Einfriermedium hinzugegeben und die Suspension in sterile Kryoröhrchen überführt. Die Einfriermedien setzten sich im Falle von MDCKII- und NRK-52E-Zellen aus 10 % DMSO, beziehungsweise im Falle von IHKE-1- und Caki-1-Zellen aus 5 % DMSO in den jeweiligen Kulturmedien zusammen. Die Kryoröhrchen wurden anschließend zunächst für 24 Stunden bei –80 °C in einer Einfrierkassette mit Isopropanol belassen um ein schonendes Einfrieren bei konstanter Einfriereschwindigkeit zu gewährleisten. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen schließlich in Aliquots zu 1–2 · 10<sup>6</sup> Zellen/ml in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und die Zellsuspension kurz bei Raumtemperatur angetaut. Um den schädlichen Einfluss des enthaltenen DMSO auf die Zellen zu minimieren, wurde direkt im Anschluss bei  $1000 \times g$  für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin in einer Zellkulturflasche ( $75 \text{ cm}^2$ ) ausgesät und zur Kultivierung im Brutschrank aufbewahrt (siehe Kapitel 1.6.4).

### 1.6.6 Zellzahlbestimmung nach Neubauer

Die Zellzahlbestimmung wurde mit Hilfe eines Hämozytometers vorgenommen. Das Prinzip beruht auf der Auszählung der Zellen in einem Kompartiment mit bekanntem Volumen mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Um dabei nur lebende Zellen zu berücksichtigen, wurde der Vitalfarbstoff Trypanblau zugegeben. Dieser ist nicht membrangängig und dringt daher nicht in intakte Zellen ein, so dass unter dem Mikroskop lebende Zellen farblos und geschädigte Zellen blau erschienen. Um die Zellzahl zu bestimmen wurde die Zellsuspension zunächst im Verhältnis 1:5 (v/v) beziehungsweise 1:10 (v/v) mit 0,4 %igem Trypanblau versetzt und ca. 25  $\mu\text{l}$  davon auf die Zählkammer aufgetragen. Daraufhin wurden die ungefärbten Zellen in den vier Eckquadraten ausgezählt und im Anschluss das arithmetische Mittel gebildet, wodurch man die durchschnittliche Anzahl an Zellen pro 100 Nanoliter Zellsuspension erhält. Die Lebendzellzahl pro Milliliter ergibt sich demnach, unter Berücksichtigung des zuvor eingeführten Verdünnungsfaktors, nach folgender Gleichung.

$$\text{Lebendzellzahl [Zellen/ml]} = \frac{\sum \text{ungefärbte Zellen}}{4} \times F_V \times F_K \quad (2-1)$$

$F_V$  Verdünnungsfaktor  
 $F_K$  Kammerfaktor (=  $10^4$  für die Umrechnung des Volumens eines Eckquadrats auf 1 ml)

## 1.7 EXPRESSIONSANALYSEN AUF MRNA-EBENE

### 1.7.1 Allgemeines

Um eine möglichst RNase-freie Umgebung zu gewährleisten wurden für alle Arbeiten mit RNA gesonderte Chemikalien, Geräte und Pipetten verwendet. Gestopfte Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden RNase-frei vom Hersteller bezogen sowie alle Glasgefäße autoklaviert. Geräte und Arbeitsflächen wurden vor der Benutzung mit *Rnase Zap*<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, München) gereinigt und alle Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt. Außerdem wurden alle Arbeitsflächen auf denen mit DNA gearbeitet wurde zuvor mit *DNA-ExitusPlus*<sup>™</sup> (AppliChem, Darmstadt) behandelt, um DNA- beziehungsweise *Template*-Kontaminationen zu verhindern.

### 1.7.2 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA inklusive eines DNase-Verdauus erfolgte mit Hilfe des *RNeasy® Mini Kits* und des *RNase-Free DNase Sets* nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden). Zur Isolation der RNA aus den zu untersuchenden Zellen wurde diese gegebenenfalls zunächst durch Trypsinierung vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst (siehe Kapitel 1.6.4) und im Anschluss die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 1.6.6). Nach Zugabe des entsprechenden Volumens Lysepuffer wurde die Homogenisierung der Lysate durch Zentrifugation für 2 min bei  $10.000 \times g$  in *QIAshredder*-Säulen durchgeführt (Qiagen, Hilden). Die Eluierung der extrahierten Gesamt-RNA erfolgte im letzten Schritt mit 30 µl RNase-freiem Wasser pro Probe. Bis zur Weiterverwendung wurde die isolierte RNA bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

#### 1.7.2.1 RNA-Quantifizierung und Kontrolle der RNA-Integrität

Durch Messen des Absorptionsspektrums im Bereich von 220–350 nm mit Hilfe des *NanoDrop™ 2000c*-Spektrophotometers (peqlab, Erlangen) wurden Quantität und Qualität der RNA in den Proben überprüft. Die RNA-Konzentration wurde aus der gemessenen Extinktion bei 260 nm errechnet. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  gibt wiederum Aufschluss über die Reinheit der isolierten RNA und sollte idealerweise einen Wert von 2,0 annehmen. Es wurden nur Proben weiterverwendet, deren  $A_{260}/A_{280}$  zwischen 1,9 und 2,1 lag.

Zur Kontrolle der RNA-Integrität wurde außerdem eine RNA-Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein 2 %iges Agarosegel mit einer Ethidiumbromidkonzentration von 0,5 µg/ml in TBE-Puffer hergestellt. Vor dem Auftragen der Proben wurden je 3 µl Ladepuffer VIII (AppliChem, Darmstadt) zu 1 µg RNA gegeben und die Proben zur Denaturierung der RNA für 10 min bei  $65\text{ °C}$  erhitzt und danach auf Eis gestellt. Als Größenmarker wurden außerdem 4 µl *RiboRuler™ High Range RNA Marker* (Fermentas, St. Leon-Rot) auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde für 150 min bei 60 V in TBE-Puffer durchgeführt. Als Maß für die Integrität der RNA wurden die beiden Banden für 18S- und 28S-rRNA herangezogen, welche möglichst scharf und deutlich voneinander getrennt zu erkennen sein sollten.

### 1.7.3 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde 1 µg isolierte Gesamt-RNA pro Probe eingesetzt und gemäß den Herstellerangaben revers transkribiert. Als Negativkontrollen wurde dabei pro Probe je ein Ansatz ohne das Enzym Reverse Transkriptase mitgeführt. Ein weiterer Ansatz, bei dem keine RNA zugegeben wurde, diente zur Kontrolle von möglichen Kontaminationen ( $\text{H}_2\text{O}$ -Kontrolle). Bis zur Weiterverwendung wurden alle Proben bei  $-20\text{ °C}$  aufbewahrt.

### 1.7.3.1 PCR zur Kontrolle der reversen Transkription

Mit Hilfe der *Polymerase chain reaction* (PCR) ist es möglich, einen definierten DNA-Abschnitt durch Inkubation mit einer thermostabilen DNA-Polymerase, entsprechenden Primern, dNTPs und  $Mg^{2+}$  in einem Puffersystem zu vervielfältigen. Durch das zyklische Wiederholen von Inkubationsschritten mit genau festgelegter Temperatur und Dauer wird der zu vervielfältigende Abschnitt auf der DNA (das *Template*) kopiert. Jeder Zyklus beginnt mit einem Denaturierungsschritt bei der die DNA in die Einzelstränge aufgeschmolzen wird. Darauf folgt das *Annealing* bei dem die Primer sich an die DNA-Einzelstränge anlagern. Im letzten Schritt, der Amplifikation, synthetisiert die DNA-Polymerase schließlich die fehlenden Einzelstränge. Das PCR-Produkt kann im Anschluss an die PCR durch eine DNA-Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung des Erfolgs der reversen Transkription, beziehungsweise zur Untersuchung der Qualität der synthetisierten cDNA, wurde das *Housekeeping*-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels einer Kontroll-PCR amplifiziert. Der dafür verwendete Reaktionsansatz ist in Kapitel 1.5.6 aufgelistet. Das Enzym Uracil-DNA-Glykosylase (UNG) wurde zur Vermeidung von *carry-over*-Kontaminationen zum Ansatz hinzugegeben. Tabelle 2-7 zeigt das verwendete *Thermocycler*-Programm. Der Nachweis des PCR-Produkts erfolgte durch eine anschließende DNA-Agarose-Gelelektrophorese mit einem 2 %igen Agarose-Gel (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid) in TAE-Puffer für 60 min bei 120 V. Aufgetragen wurden je 20  $\mu\text{l}$  Probe sowie 6  $\mu\text{l}$  *GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) als Größenmarker. Es wurde darauf geachtet, dass keine der Proben eine Verunreinigung in Form von genomischer DNA enthielt und eine deutliche Bande im Bereich des GAPDH-Amplikons zu erkennen war.

Tabelle 2-7: *Thermocycler*-Programm für die PCR zur Kontrolle der reversen Transkription

Phase	Temp.	Zeit	Zyklen
<b>Anfangsdenaturierung</b>	94 °C	3 min	1
<b>Denaturierung</b>	94 °C	45 s	
<b>Annealing</b>	59 °C	30 s	35
<b>Amplifikation</b>	72 °C	60 s	
<b>Finale Amplifikation</b>	72 °C	5 min	1

### 1.7.4 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) ist es möglich, die während der PCR entstandene dsDNA zu quantifizieren. Das Prinzip beruht auf dem der herkömmlichen PCR, bei der sich mit jedem Zyklus die Menge an PCR-Produkt verdoppelt. Zusätzlich wird dem Reaktionsansatz ein Fluoreszenzfarbstoff (z. B. *SYBR® Green I*) zugefügt, dessen Fluoreszenzintensität durch Interkalierung in die dsDNA

zunimmt. Nach jedem Zyklus wird die Zunahme der Fluoreszenz in Echtzeit (*real-time*) detektiert. Entsprechend nimmt das gemessene Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produktes zu. Je größer nun die in der Probe vorhandene Ausgangsmenge an *Template* ist, desto eher überschreitet die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert (*Threshold*) bei dem das Signal sich von der gemessenen Hintergrundfluoreszenz abhebt und die Amplifikation in die exponentielle Phase übergeht. Der Zyklus in dem dies geschieht wird auch als *Cycle Threshold* ( $C_T$ ) bezeichnet und ist ein Maß für die in der Probe vorhandene Menge des untersuchten cDNA-Fragments.

Die qPCR wurde mit dem *QuantiTect® SYBR® Green Kit* (Qiagen, Hilden) in einem *Step One Plus™ Real-Time PCR Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Die cDNA wurde zunächst 1:10 (v/v) mit RNase-freiem Wasser verdünnt und zu dem vorbereiteten Reaktionsansatz (siehe Kapitel 1.5.6) in *Thermo-Fast® 96-Loch-PCR-Platten* (Thermo Fisher Scientific, Ulm) gegeben. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2-3 und Tabelle 2-4 aufgelistet. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Platten wurden anschließend mit Folie verschlossen und die qPCR gestartet. Das verwendete *Cycler-Programm* ist in Tabelle 2-8 dargestellt. Als Negativkontrollen wurden die Proben ohne Reverse Transkriptase aus der cDNA-Synthese sowie H<sub>2</sub>O-Kontrollen, bei denen keine cDNA zugegeben wurde, eingesetzt.

Tabelle 2-8: *Real-time PCR Cycler-Programm* für die qPCR

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
<b>Aktivierung</b>			
	95 °C	15 min	1
<b>Quantifizierung</b>			
Denaturierung	94 °C	15 s	
<i>Annealing</i>	55 °C	30 s	40
Amplifikation	72 °C	30 s	
<b>Schmelzkurve</b>			
Denaturierung	95 °C	15 s	
<i>Annealing</i>	60 °C	60 s	1
Schmelzen	96 °C	15 s	

Zur Auswertung der Expressionslevel der untersuchten Gene (Zielgene) in den Proben wurden die relativen Expressionen mit Hilfe der  $\Delta C_T$ -Methode ermittelt. Dabei wird die Expression der Zielgene mit der eines *Housekeeping*-Gens verglichen, das heißt „normalisiert“, indem der  $\Delta C_T$ -Wert für jede Probe bestimmt wird. Als Referenzgen wurde dafür GAPDH gewählt:

$$\Delta C_T(\text{Probe}) = (C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{GAPDH}))_{\text{Probe}} \quad (2-2)$$

Um die relativen Expressionen zwischen den Proben besser miteinander zu vergleichen wurde außerdem die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet (Livak and Schmittgen, 2001). Dabei wurde zusätzlich der  $\Delta C_T$ -Wert für eine Kalibratorprobe, auf die die Expression der Zielgene bezogen wird, bestimmt:

$$\Delta C_T(\text{Kalibrator}) = (C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{GAPDH}))_{\text{Kalibrator}} \quad (2-3)$$

Anschließend wurde der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert aus der Differenz der beiden  $\Delta C_T$ -Werte errechnet:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Kalibrator}) - \Delta C_T(\text{Probe}) \quad (2-4)$$

Die relative Expression ( $E_r$ ) des Zielgens in der Probe ergab sich dann nach:

$$E_r = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (2-5)$$

## 1.8 EXPRESSIONSANALYSEN UND FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN AUF PROTEIN-EBENE

### 1.8.1 Proteinisolation

#### 1.8.1.1 Herstellung von Gesamtlysate aus kultivierten Zellen

Vor Versuchsbeginn wurde zunächst die benötigte Menge an Lysepuffer hergestellt, indem *Complete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (25×) im Verhältnis 1:25 (v/v) mit RIPA-Puffer vermischt wurde. Zur Präparation von Proteinlysaten aus den kultivierten Zelllinien und Primärzellen wurde der Zell-Monolayer zunächst einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Dieser und alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Anschließend wurde eiskalter Lysepuffer zugegeben (1 ml pro 162 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche) und die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Das Lysat wurde danach in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und unter kontinuierlichem Schütteln für 30 min bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 10.000 × g und 4 °C pelletiert und der Überstand in ein neues vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 10.000 × g und 4 °C wurde der Überstand aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 1.8.1.2 Isolation von Membranproteinen aus kultivierten Zellen

Um die Membranfraktion zu isolieren, wurde zunächst ein Gesamtproteinlysate der Zellen hergestellt (siehe Kapitel 1.8.1.1). Der aufgereinigte Überstand wurde mit Lysepuffer auf 12 ml aufgefüllt und in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde bei 100.000 × g und 4 °C für 90 min zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lysepuffer aufgenommen. Das Resuspendieren fand über Nacht bei 4 °C unter Schütteln statt. Die so gewonnenen Membranproteine wurden aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 1.8.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der Proteingehalt in den hergestellten Zelllysaten wurde mit Hilfe der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode quantifiziert. Dazu wurde das *BCA™ Protein Assay Kit* von Thermo Fisher Scientific (Ulm) verwendet. Das Assay-Prinzip beruht auf der Biuret-Reaktion, unter der man die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch Peptide und Proteine in alkalischem Milieu versteht. Das durch die Biuret-Reaktion entstandene  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion wird anschließend in einer zweiten Reaktion durch BCA komplexiert, wodurch ein intensiv violett gefärbter Chelatkomplex entsteht, welcher bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch detektiert werden kann. Da die Anzahl der gebildeten BCA/ $\text{Cu}^{1+}$ -Komplexe proportional zur Anzahl der vorhandenen Proteine ist, kann die Methode zur Quantifizierung von Proteinen in wässriger Lösung verwendet werden (Redinbaugh and Turley, 1986; Smith *et al.*, 1985). Es wurden unterschiedliche Verdünnungsansätze der Proben jeweils als Doppelansatz in RIPA-Puffer erstellt und das Kit gemäß den Herstellerangaben im 96-Loch-Mikrotiterplatten-Format verwendet. Anschließend wurde die Extinktion bei 570 nm gemessen und die Proteinkonzentration in den Proben mit Hilfe einer aus einer BSA-Verdünnungsreihe erstellten Kalibriergeraden ermittelt.

### 1.8.2 LDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE)

Zur Größenauftrennung der Proteine in den gewonnenen Lysaten wurde die LDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Gelelektrophoresevariante, bei der die aufzutrennenden Proteine durch eine Trägermatrix aus Polyacrylamid wandern. Durch Zugabe des anionischen Detergens Lithiumdodecylsulfat (LDS) werden die Proteine zunächst denaturiert und deren Eigenladung überdeckt, so dass ein konstantes Masse zu-Ladung-Verhältnis ( $m/q$ ) vorliegt und die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine während der Elektrophorese im Wesentlichen von deren Größe abhängt. Zur vollständigen Denaturierung wird außerdem Dithiothreitol (DTT) zu den Proben gegeben um vorhandene Disulfidbrücken zu spalten. Als Elektrophoresesystem kam das *NuPAGE®*-System von Invitrogen (Karlsruhe) zum Einsatz, bei dem eine diskontinuierliche Elektrophorese mit Sammel- und Trenngel durchgeführt wird. Das Puffersystem bestand aus einer Kombination von Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis Tris) im Gel- und 3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure (MOPS) im Elektrophoresepuffer.

Zur Auftrennung wurde das für die einzusetzende Proteinmenge benötigte Probenvolumen zunächst mit dem fünffachen Volumen (v/v) eiskaltem Aceton versetzt und die Proteine bei  $-80\text{ °C}$  über Nacht ausgefällt. Am nächsten Tag wurden die Proteine bei  $8000 \times g$  für 7 min bei  $4\text{ °C}$  abzentrifugiert. Nach Absaugen und Verwerfen des Überstands wurde das verbleibende Aceton durch Inkubation für etwa 5 min bei  $55\text{ °C}$  entfernt und das Pellet in Probenpuffer resuspendiert. Anschließend wurden zur Denaturierung der Proteine alle Proben für 10 min bei  $70\text{ °C}$  unter starkem Schütteln ( $1200\text{ rpm}$ ) im Thermoinkubationsmischer inkubiert. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese kurz durchmischt und

zentrifugiert und die Geltaschen zum Entfernen störender Acrylamidreste mit MOPS-Puffer gespült. Daraufhin wurde das Gel (*NuPAGE*<sup>®</sup> 4–12 % Bis Tris, Invitrogen, Karlsruhe) beladen und die Elektrophorese bei einer konstanter Spannung von 200 V für 50 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Marker wurde eine 1:1-Mischung (v/v) der beiden Proteinstandards *SeeBlue*<sup>®</sup> *Plus2* und *Magic Mark*<sup>™</sup> *XP* (beide Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

### 1.8.3 Western Blot

Um spezifische Proteine in den zuvor mit Hilfe der LDS-PAGE aufgetrennten Gesamtlösungen nachzuweisen, wurde das *Western Blot*-Verfahren angewendet. Dabei werden die Proteine nach der Gelelektrophorese von der Trägermatrix des Polyacrylamid-Gels elektrophoretisch auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) transferiert, wo sie durch hydrophobe Wechselwirkungen haften bleiben. Durch diese Immobilisierung auf der Trägermembran können schließlich einzelne Proteine durch Interaktion mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Zum Ansetzen der Primäantikörper wurden diese in Blockpuffer verdünnt und 0,1 % (v/v) NaN<sub>3</sub> zur Konservierung zugegeben. Die Verdünnung der Sekundäantikörper erfolgte in Blockpuffer. Alle verwendeten Antikörper sowie deren Verdünnungen sind in Tabelle 2-1 und Tabelle 2-2 aufgelistet.

Vor Beginn des Transfers wurde die PVDF-Membran für 30 s in MeOH aktiviert und alle verwendeten Filterpapiere und Fiberglaskissen für 30 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer fand in Form eines *Semi dry blots* mit der *XCell SureLock*<sup>™</sup> *Mini Cell* und dem *Xcell II Blot Module* (Invitrogen, Karlsruhe) für 60 min bei 30 V unter Eiskühlung statt. Anschließend wurde zum Nachweis der gesuchten Proteine auf der Membran eine Immundetektion durchgeführt. Durch Inkubation der Membran mit Blockpuffer für 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C wurden zunächst die freien Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt. Nach zweimaligem kurzem Spülen mit TBS-T wurde die Membran unter Schütteln über Nacht bei 4 °C oder für 120 min bei Raumtemperatur mit dem Primäantikörper inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde am nächsten Tag durch zweimal kurzes Waschen und zweimal 10 min Waschen mit TBS-T entfernt. Danach wurde die Membran für 60 min bei Raumtemperatur mit dem *Horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundäantikörper unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend erneut gewaschen (zweimal kurz und zweimal 10 min). Nach kurzem Trocknen der Membran wurde zur Detektion Luminol und *Oxidizing Reagent* (*Western Lightning*<sup>®</sup> *Plus-ECL Kit*, PerkinElmer, Rodgau) im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Membran gegeben (~0,125 ml/cm<sup>2</sup>) und 1 min inkubiert. Hierbei katalysiert die an den Sekundäantikörper gekoppelte HRP die Oxidation von Luminol durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wodurch eine Chemilumineszenz hervorgerufen wird. Das dabei emittierte Licht wurde nach Entfernen der ECL-Reagenzien von der Membran mit einer CCD-Kamera mit Hilfe des *ChemiDoc*<sup>™</sup> *XRS-Systems* (Bio-Rad, München) detektiert. Die densitometrische Auswertung der aufgenommenen Bilder erfolgte mit dem Programm *Quantity One 4.6* von Bio-Rad.

Zur semi-quantitativen Auswertung wurde eine unspezifische Proteinfärbung der Membran durchgeführt und jedes Chemilumineszenzsignal auf die Menge an Gesamtprotein in der entsprechenden Spur normalisiert (Aldridge *et al.*, 2008; Romero-Calvo *et al.*, 2010). Zur Durchführung der Proteinfärbung wurde die Membran nach der Detektion zunächst dreimal kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Proteine wurden durch anschließendes Inkubieren für 1 min unter leichtem Schütteln in *Amido Black*-Lösung angefärbt und überschüssige Färbelösung durch Waschen (zweimal 1 min in Entfärbelösung und zweimal 10 min in ddH<sub>2</sub>O) wieder entfernt. Nach Trocknen der Membran für mindestens 60 min wurde diese mit einer CCD-Kamera fotografiert und der Gesamtproteingehalt jeder Spur durch densitometrische Auswertung mit der *Quantity One* Software ermittelt.

Um unterschiedliche Proteine auf einer Membran ohne erneute gelelektrophoretische Auftrennung und Transfer nachzuweisen, wurden die gebundenen Antikörper nach erfolgter Detektion wieder entfernt. Dieser Vorgang wird als *Stripping* bezeichnet. Dazu wurde die Membran im Anschluss an die Detektion kurz mit TBS-T gewaschen und danach für 20 min bei 56 °C mit *Stripping*-Puffer inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran in TBS-T (zweimal kurz und zweimal 10 min) fand, wie oben beschrieben, zunächst eine Absättigung der freien Proteinbindungsstellen durch Inkubation in Blockpuffer statt. Anschließend wurde die Membran mit den entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert und das Chemilumineszenzsignal detektiert.

#### 1.8.4 Immunfluoreszenz (IF)

Zur Visualisierung und intrazellulären Lokalisation von *Tight-Junction*-Proteinen wurde auf eine immunzytochemische Färbung mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern zurückgegriffen (indirekte Immunfluoreszenz). Das Grundprinzip beruht ebenso wie die indirekte Immundetektion beim *Western Blot* (siehe Kapitel 1.8.3) auf dem Einsatz von gegen das zu untersuchende Protein gerichteten Primär- und gegen deren entsprechenden IgG-Typ gerichteten Sekundärantikörpern. Eine Liste der verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen finden sich in Tabelle 2-1 und Tabelle 2-2. Alle Antikörper wurden in IF-Puffer angesetzt.

Für die Immunfluoreszenz wurden die zu untersuchenden Zellen auf 8-Loch-Kammer-Objektträgern (*Lab-Tek® Chamber Slides™*, Thermo Fisher Scientific, Ulm) ausgesät und unter Standard-Kulturbedingungen (siehe Kapitel 1.6.4) kultiviert. Um das Austrocknen der Objektträger während der Inkubationszeiten zu verhindern fanden alle folgenden Inkubationsschritte in einer mit VE-Wasser befüllten Feuchtkammer statt. Die konfluent gewachsenen Zellen wurden am Versuchstag zunächst dreimal mit eiskaltem PBS ([+Ca<sup>2+</sup>, +Mg<sup>2+</sup>) gewaschen und im Anschluss durch zehnmütige Inkubation mit -20 °C kaltem MeOH bei -20 °C im Tiefkühler fixiert und permeabilisiert. Das MeOH wurde abgegossen und der *Monolayer* erneut mit eiskaltem PBS gewaschen. Daraufhin folgte zum Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen die Inkubation mit IF-Puffer für 90 min bei Raumtemperatur. Nach Abgießen

des IF-Puffers wurde der Primärantikörper zugegeben und für 90 min bei 4 °C inkubiert. Der Primärantikörper wurde verworfen und nach einem weiteren Waschschriff mit eiskaltem PBS folgte die Inkubation mit Cyanin 3 (Cy3)-markiertem Sekundärantikörper für ebenfalls 90 min bei 4 °C. Schließlich wurden nach erneutem dreimaligem Waschen die Zellkerne durch Zugabe von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für 5 min bei Raumtemperatur angefärbt. Nachdem das DAPI verworfen und die *Monolayer* ein letztes Mal gewaschen wurden, wurden die Kammeraufsätze entfernt und die Zellen einmal kurz vorsichtig mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Nach dem Eindecken mit Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Eppelheim) wurden die Ergebnisse entweder direkt ausgewertet oder die Objektträger zur Lagerung mit Nagellack versiegelt und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Dokumentation der Fluoreszenzsignale erfolgte an einem *Axiovert 200* Fluoreszenzmikroskop mit einem LD Plan-NEOFLUAR 20x/0.4-Objektiv und einer *AxioCam MRm* CCD-Kamera unter Verwendung der *AxioVision* Software (Carl Zeiss, Jena). Die Belichtungszeit betrug bei allen Aufnahmen 1000 ms für das Cy3- und 65 ms für das DAPI-Signal.

### 1.8.5 Bestimmung der Enzymaktivität von $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 (GGT1)

Die  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 (GGT1) wird in der Niere hauptsächlich in den Mikrovilli der proximalen Tubuli exprimiert und wurde daher als Marker-Enzym für diese verwendet (Boogaard *et al.*, 1990; Chan *et al.*, 1996; Dietrich *et al.*, 2001; Evans, 1994; Courjault-Gautier, 1995; Gildea *et al.*, 2010; Glube *et al.*, 2007b; Lash and Tokarz, 1989; Lash, 2001; Price *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2007; Sikka and McMartin, 1996; Toutain *et al.*, 1990; Weiland *et al.*, 2007). Zur Aktivitätsbestimmung der GGT1 wurde ein kolorimetrischer Assay im 96-Loch-Mikrotiterplatten-Format nach Silber *et al.* durchgeführt (Silber *et al.*, 1986). Dabei wird die durch GGT1 katalysierte Umsetzung des Substratanalogs  $\gamma$ -Glutamyl-p-Nitroanilid (GPNA) zu p-Nitroanilin (pNA) untersucht. Aufgrund seines aromatischen Ringsystems kann die Menge an entstandenem pNA bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch detektiert werden. Die gemessene Absorption ist direkt proportional zur Enzymaktivität, wodurch diese durch Messen der Zunahme der Extinktion bei 405 nm (entspricht der Zunahme an pNA) ermittelt werden kann.

Die Aktivitätsbestimmung wurde wie folgt durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurden zunächst die GPNA-Lösung sowie die Arbeitslösung frisch angesetzt und die Proteinkonzentration der Proben mit RIPA-Puffer auf 0,033  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (1,0  $\mu\text{g}/\text{Loch}$ ) eingestellt. Anschließend wurden 280  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O für den Leerwert, 30  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O für den Reagenz-Leerwert (misst die spontane Hydrolyse des GPNA) und je 30  $\mu\text{l}$  Probe (alles als Doppelbestimmung) in leere Löcher vorgelegt. Außerdem wurde eine pNA-Standardreihe mitgeführt (3–60 nmol/Loch). Zum Starten der Reaktion wurden je 250  $\mu\text{l}$  Arbeitslösung zu den Proben und dem Reagenz-Leerwert zugegeben. Da es sich um eine zeitabhängige Reaktion handelt, wurden Proben und Arbeitslösung möglichst schnell nacheinander zusammenpipettiert. Nach sofortigem Messen der Extinktion bei 405 nm wurden die Ansätze für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion erneut gemessen um die Änderungsrate zu erhalten. Aus dieser wurde nach Abzug

der beiden Leerwerte die Menge an entstandenem pNA mit Hilfe der aus der pNA-Standardreihe ermittelten Kalibriergeraden errechnet. Die Enzymaktivität der GGT1 in den Proben wurde schließlich nach folgender Formel ermittelt (Silber *et al.*, 1986):

$$a_{GGT1} [U/l] = c_{pNA} [nmol] \times 3,33 \quad (2-6)$$

$a_{GGT1}$  Enzymaktivität GGT1  
 $c_{pNA}$  ermittelte Nettokonzentration von pNA in der Probe

## 1.9 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNGEN DER ZELLEN

### 1.9.1 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) ist definiert als der elektrische Widerstand über einen epithelialen Zell-*Monolayer*, das heißt es wird der Ionenfluss durch den *Monolayer* gemessen. Der TEER-Wert gilt als ein Indikator für die Dichtigkeit eines *Monolayers* und der vorhandenen *Tight Junctions*, da der Ionenfluss hauptsächlich durch diese stattfindet (Gaillard and de Boer, 2000; Lehr, 2003).

Zur Bestimmung der TEER-Werte wurden die Zellen auf permeablen Membranfiltereinsätzen (*Transwell® Inserts*, 12 mm, 0,4 µm Porengröße, Corning, Wiesbaden) in 12-Loch-Zellkulturplatten mit einer Aussaatdichte von  $0,15 \cdot 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert (siehe Kapitel 1.6.4). Das Messen der Widerstände erfolgte mit dem Volt-Ohm-Meter *Millicell®-ERS* (Millipore, Billerica, USA) mit sogenannten *Chopstick*-Elektroden in warmem Kulturmedium. Da die Höhe der Messwerte temperaturabhängig ist, wurden die Messungen möglichst zügig durchgeführt um Temperaturschwankungen zu vermeiden. Darüber hinaus wurde stets darauf geachtet, dass die Elektroden keinen direkten Kontakt zu den Zellen oder den Wänden der Filtereinsätze haben, da dies ebenfalls die Messung beeinflussen kann. Der gemessene Wert wurde auf die Membranfläche bezogen und der TEER-Wert nach folgender Formel berechnet:

$$TEER [\Omega \times cm^2] = R [\Omega] \times A_{Membran} [cm^2] \quad (2-7)$$

TEER Transepithelialer elektrischer Widerstand  
 R gemessener elektrischer Widerstand  
 $A_{Membran}$  Flächeninhalt der Membran

### 1.9.2 Transportstudien

#### 1.9.2.1 Bidirektionale Transportversuche

Für die bidirektionalen Transportversuche wurden die Zellen auf permeablen Membranfiltereinsätzen (*Transwell® Inserts*, 12 mm, 0,4 µm Porengröße, Corning, Wiesbaden) in 12-Loch-Zellkulturplatten mit

einer Aussaatdichte von  $0,15 \cdot 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert (siehe Kapitel 1.6.4). Durch die Kultivierung der Zellen auf *Transwell*<sup>®</sup>-Filtereinsätzen sind sowohl die apikale als auch die basolaterale Seite zugänglich, so dass der vektorielle Transport von Substanzen über den Zell-*Monolayer* untersucht werden kann.

Vor Versuchsbeginn wurden zunächst die Substanzlösungen hergestellt und auf 37 °C vortemperiert sowie die Dichtigkeit der *Monolayer* durch Bestimmung der TEER-Werte untersucht (siehe Kapitel 1.9.1). Als Testsubstanzen wurden [<sup>14</sup>C]-Mannitol, [<sup>14</sup>C]-TEA, [<sup>3</sup>H]-Clonidin und [<sup>3</sup>H]-PAH eingesetzt. Die Mannitol- und TEA-Substanzlösungen wurden als 100×-Stammlösung aus [<sup>14</sup>C]-markierter Substanz in DMSO angesetzt und für den finalen Ansatz 1:100 mit Opti-MEM<sup>®</sup> verdünnt. Die PAH-Substanzlösung wurde aus [<sup>3</sup>H]-markierter und nicht-markierter Substanz (10 mM Vorratslösung) angesetzt (siehe Tabelle 2-9).

**Tabelle 2-9: Übersicht über die für die bidirektionalen Transportversuche eingesetzten Substrate**

Substanz	Stammlösung	Finaler Ansatz			
		C <sub>markiert</sub>	C <sub>Gesamt</sub>	C <sub>Gesamt</sub>	Aktivität
<b>Mannitol</b>	100×	600,00 µM	600 µM	6 µM	12,50 KBq/ml
<b>TEA</b>	100×	1000,00 µM	1000 µM	10 µM	1,25 KBq/ml
<b>Clonidin</b>	100×	1,10 µM	1000 µM	10 µM	25,00 KBq/ml
<b>PAH</b>	100×	14,82 µM	1000 µM	10 µM	25,00 KBq/ml

Es wurde für jede untersuchte Substanz sowohl der Transport von apikal nach basolateral (ap-bas), als auch in umgekehrte Richtung von basolateral nach apikal (bas-ap) untersucht. Dazu wurde das Substrat zu Versuchsbeginn entweder in das apikale (ap-bas) oder in das basolaterale Kompartiment (bas-ap) gegeben. Alle Versuche wurden dabei im Doppelansatz durchgeführt. Als erstes wurden von den angesetzten Substanzlösungen je zweimal 100 µl-Proben entnommen ( $P_{S_1}$ ). Dann wurden die Filter einmal mit warmem Transportpuffer gewaschen (0,5 ml apikal, 1,5 ml basolateral) und anschließend in frischem Transportpuffer für 10 min bei 37 °C äquilibriert. Im Donorkompartiment wurde danach der Transportpuffer abgesaugt, die jeweilige Substanzlösung zugegeben (0,6 ml apikal, 1,6 ml basolateral) und für 10 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln vorinkubiert. Nach Entnahme einer 100 µl-Probe aus dem Donorkompartiment ( $P_{Don, t=0}$ ) wurde der Transportpuffer im Akzeptorkompartiment abgesaugt und durch frischen Puffer ersetzt (0,5 ml apikal, 1,5 ml basolateral). Daraufhin wurde für 120 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde je eine 100 µl-Probe aus dem Donorkompartiment ( $P_{Don, t=120}$ ) und eine Probe aus dem Akzeptorkompartiment ( $P_{Akz, t=120}$ , 0,3 ml apikal, 0,5 ml basolateral) entnommen. Zur Bestimmung der Substanzakkumulation in den Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen des *Monolayers* mit 0,6 ml PBS das Ablösen der Zellen durch Zugabe von 0,2 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %) und anschließende Inkubation für 5 min

bei 37 °C ( $P_z$ ). Alle Proben wurden direkt in Szintillationsröhrchen überführt und nach Zugabe von 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Biofluor Plus, PerkinElmer, Rodgau) im Szintillationszähler vermessen. Eine Übersicht über die entnommenen Proben gibt Tabelle 2-10.

**Tabelle 2-10: Übersicht über die bei den bidirektionalen Transportversuchen entnommenen Proben**

Probe		ap-bas		bas-ap	
		Kompartiment	Volumen	Kompartiment	Volumen
$P_{SL}$	Substanzlösung	-	100 $\mu$ l	-	100 $\mu$ l
$P_{Don, t=0}$	Donor, 0 min	apikal	100 $\mu$ l	basolateral	100 $\mu$ l
$P_{Don, t=120}$	Donor, 120 min	apikal	100 $\mu$ l	basolateral	100 $\mu$ l
$P_{Akz, t=120}$	Akzeptor, 120 min	basolateral	500 $\mu$ l	apikal	300 $\mu$ l
$P_z$	Zellen	Membran	200 $\mu$ l	Membran	200 $\mu$ l

Mit Hilfe der gemessenen Aktivitäten wurden die apparenten Permeationskoeffizienten ( $P_{app}$ ) der untersuchten Testsubstanzen für den Transport vom apikalen zum basolateralen Kompartiment (ap-bas) und vom basolateralen zum apikalen Kompartiment (bas-ap) errechnet. Der  $P_{app}$  ist ein verbreiteter Parameter um die Permeationseigenschaften einer Substanz über einen *Zell-Monolayer* zu beschreiben und errechnet sich nach folgender Formel:

$$P_{app} = \frac{V_{Akz}}{A_{Membran} \times c_{Don, t=0}} \times \frac{\Delta c_{Akz}}{\Delta t} \quad (2-8)$$

$P_{app}$	apparenter Permeationskoeffizient [nm/s]
$V_{Akz}$	Puffervolumen im Akzeptorkompartiment [ml]
$A_{Membran}$	Flächeninhalt der Membran [cm <sup>2</sup> ]
$c_{Don, t=0}$	Substanzkonzentration im Donorkompartiment zum Zeitpunkt t = 0 min [dpm/ml]
$\Delta c_{Akz}/\Delta t$	Änderung der Substanzkonzentration über die Zeit im Akzeptorkompartiment [dpm · ml <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup> ]

Als weiterer Parameter wurde aus den beiden Permeationskoeffizienten nach Gleichung 2-9 der sogenannte *Efflux Ratio* (ER) ermittelt. Mit Hilfe des ER lässt sich eine Aussage über die Transporteigenschaften der entsprechenden Substanz machen. So weist ein ER nahe 1 auf einen passiven Transport hin. Bei einem ER > 2 wird von einem aktiven Transport von basolateral nach apikal und bei einem ER < 0,5 von einer aktiven Absorption der Substanz aus dem apikalen Kompartiment ausgegangen.

$$ER = \frac{P_{app}(ap - bas)}{P_{app}(bas - ap)} \quad (2-9)$$

$P_{app}(ap-bas)$	apparenter Permeationskoeffizient von apikal nach basolateral [nm/s]
$P_{app}(bas-ap)$	apparenter Permeationskoeffizient von basolateral nach apikal [nm/s]

### 1.9.2.2 Aufnahmeversuche mit Zell-Monolayern

Für die Aufnahmeversuche mit Zell-Monolayern wurden die Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und unter Standardbedingungen für 5 Tage kultiviert (siehe Kapitel 1.6.4). Als Testsubstanzen wurden [<sup>3</sup>H]-PAH und [<sup>3</sup>H]-MPP+ eingesetzt. Die entsprechenden Substanzlösungen wurden zunächst als 100×-Stammlösung aus [<sup>3</sup>H]-markierter und nicht-markierter Substanz (10 mM Vorratslösung) in DMSO angesetzt und für den finalen Ansatz 1:100 mit Transportpuffer verdünnt (siehe Tabelle 2-11). Für die Inhibitionsversuche wurden 400×-Stammlösungen angesetzt und diese ebenfalls 1:100 mit Transportpuffer verdünnt um eine 4×-Vorverdünnung zu erhalten (siehe Tabelle 2-12).

Tabelle 2-11: Übersicht über die für die Aufnahmeversuche mit Zell-Monolayern eingesetzten Substrate

Substanz	Stammlösung	Stammlösung		Finaler Ansatz	
		C <sub>markiert</sub>	C <sub>Gesamt</sub>	C <sub>Gesamt</sub>	Aktivität
PAH	100×	14,82 µM	1000 µM	10 µM	25 KBq/ml
MPP+	100×	0,81 µM	1000 µM	10 µM	25 KBq/ml

Tabelle 2-12: Übersicht über die für die Inhibitionsversuche mit Zell-Monolayern eingesetzten Substrate

Substanz	Stammlösung	Vorverdünnung				Finaler Ansatz		
		C <sub>markiert</sub>	C <sub>Gesamt</sub>	Vorverdünnung	C <sub>Gesamt</sub>	Aktivität	C <sub>Gesamt</sub>	Aktivität
PAH	400×	59,27 µM	1000 µM	4×	40 µM	100 KBq/ml	10 µM	25 KBq/ml
MPP+	400×	3,22 µM	4000 µM	4×	40 µM	100 KBq/ml	10 µM	25 KBq/ml

Die verwendeten Inhibitoren wurden als 200×-Stammlösung angesetzt und für den Versuch zunächst 1:100 verdünnt. Von dieser 2×-Vorverdünnung wurden 150 µl pro Probe eingesetzt, so dass sich im finalen Ansatz eine Endkonzentration von 500 µM ergab (siehe Tabelle 2-13).

Tabelle 2-13: Übersicht über die in den Aufnahmeversuchen eingesetzten Inhibitoren

Inhibitor	Substrat	Stammlösung	Vorverdünnung		Final
			C <sub>Gesamt</sub>	Vorverdünnung	C <sub>Gesamt</sub>
Probenecid	PAH	200×	100 mM	2×	1000 µM
Diclofenac	PAH	200×	100 mM	2×	1000 µM
Furosemid	PAH	200×	100 mM	2×	1000 µM
Phenacetin	PAH	200×	100 mM	2×	1000 µM
Ibuprofen	PAH	200×	100 mM	2×	1000 µM
Cimetidin	MPP+	200×	100 mM	2×	1000 µM
Clonidin	MPP+	200×	100 mM	2×	1000 µM
Desipramin	MPP+	200×	100 mM	2×	1000 µM
Ranitidin	MPP+	200×	100 mM	2×	1000 µM
Verapamil	MPP+	200×	100 mM	2×	1000 µM

Alle Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurden die Substanzlösungen frisch angesetzt und zusammen mit dem benötigten Volumen Transportpuffer auf 37 °C vortemperiert. Die Zell-*Monolayer* wurden zunächst dreimal mit 500 µl warmem Transportpuffer gewaschen und kurz äquilibriert. Nach Absaugen des Transportpuffers wurden zum Start des Versuchs 300 µl Substanzlösung (1×) zugegeben und die Platten im Wasserbad bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Falle der Inhibitionsversuche wurde stattdessen zunächst 75 µl Transportpuffer vorgelegt und 150 µl Inhibitorlösung (2×) zugegeben. Nach einer einminütigen Vorinkubation wurde der Versuch schließlich durch Zugabe von 75 µl Substanzlösung (4×) gestartet und die Platten für 5 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die *Monolayer* dreimal mit eiskaltem Transportpuffer gewaschen und 400 µl Lysepuffer zugegeben. Die Lyse der Zellen fand daraufhin für 10–15 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde das Lysat in Szintillationsröhrchen überführt und nach Zugabe von 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Biofluor Plus, PerkinElmer, Rodgau) im Szintillationszähler vermessen.

### 1.9.2.3 Aufnahmeversuche mit Suspensionszellen

Die Aufnahmeversuche mit Suspensionszellen wurden in Form eines Ölfiltrationsversuches mit dem *Hepatocyte Transporter Suspension Assay Kit* (BD, Heidelberg) nach Herstellerangaben mit leichten Modifikationen durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurden 100 µl NaOH (2 N) pro *Easy-Cut*-Reaktionsgefäß vorgelegt, vorsichtig mit 100 µl Filtrationsöl überschichtet und kurz abzentrifugiert. Danach wurden die benötigten Substanzlösungen angesetzt und auf 37 °C vortemperiert (siehe Tabelle 2-14 und Tabelle 2-15). Als Testsubstanzen wurden analog zu Kapitel 1.9.2.2 [<sup>3</sup>H]-PAH und [<sup>3</sup>H]-MPP+ eingesetzt. Die verwendeten Inhibitoren und deren Konzentrationen sind ebenfalls zu denen aus Kapitel 1.9.2.2 analog und Tabelle 2-13 zu entnehmen.

Tabelle 2-14: Übersicht über die für die Aufnahmeversuche mit Suspensionszellen eingesetzten Substrate

Substanz	Stammlösung	Vorverdünnung			Finaler Ansatz			
		C <sub>markiert</sub>	C <sub>Gesamt</sub>	C <sub>Gesamt</sub>	Aktivität	C <sub>Gesamt</sub>	Aktivität	
PAH	300×	44,46 µM	3000 µM	3×	30 µM	75 KBq/ml	10 µM	25 KBq/ml
MPP+	300×	2,43 µM	3000 µM	3×	30 µM	75 KBq/ml	10 µM	25 KBq/ml

Tabelle 2-15: Übersicht über die für die Inhibitionsversuche mit Suspensionszellen eingesetzten Substrate

Substanz	Stammlösung	Vorverdünnung			Finaler Ansatz			
		C <sub>markiert</sub>	C <sub>Gesamt</sub>	C <sub>Gesamt</sub>	Aktivität	C <sub>Gesamt</sub>	Aktivität	
PAH	400×	59,27 µM	1000 µM	4×	40 µM	100 KBq/ml	10 µM	25 KBq/ml
MPP+	400×	3,22 µM	4000 µM	4×	40 µM	100 KBq/ml	10 µM	25 KBq/ml

Zu Beginn wurden die Zellen mit Transportpuffer auf eine Konzentration von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml beziehungsweise  $4 \cdot 10^6$  Zellen/ml (für Inhibitionsversuche) eingestellt und kurz im Wasserbad bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  äquilibriert. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Es wurden  $50 \text{ }\mu\text{l}$  Substanzlösung (3 $\times$ ) pro Loch einer 48-Loch-Zellkulturplatte vorgelegt und zum Start des Versuchs  $100 \text{ }\mu\text{l}$  Zellsuspension ( $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml) hinzugegeben und dreimal auf- und abpipettiert. Für die Versuche mit Inhibitoren wurden  $50 \text{ }\mu\text{l}$  Zellsuspension ( $4 \cdot 10^6$  Zellen/ml) vorgelegt,  $100 \text{ }\mu\text{l}$  Inhibitor (2 $\times$ ) zugegeben und 1 min vorinkubiert. Danach folgte die Zugabe von  $50 \text{ }\mu\text{l}$  Substanzlösung (4 $\times$ ) und eine Inkubation von 5 min. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktionslösung vorsichtig auf das Filtrationsöl in den *Easy-Cut*-Reaktionsgefäßen überschichtet und diese für 30 s bei 14.000 rpm und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Zur alkalischen Lyse der Zellen in NaOH folgte eine Inkubation der Reaktionsgefäße für 120 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Proben über Nacht bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gefroren. Am nächsten Tag wurde mit der Aufarbeitung der Proben fortgefahren. Dazu wurden die Reaktionsgefäße über ein Szintillationsröhrchen gehalten und mit einem Plastik-*Cutter* in der Mitte der Ölschicht durchtrennt, so dass die untere Hälfte mit dem Zellpellet im Szintillationsröhrchen verbleibt. Nach Zugabe von 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Biofluor Plus, PerkinElmer, Rodgau) und  $100 \text{ }\mu\text{l}$  HCl (2 N) zur Neutralisierung wurde das Zellpellet durch Pipettieren aus dem *Easy-Cut*-Reaktionsgefäß gelöst und die Pipettenspitze in das Szintillationsröhrchen abgeworfen. Nach kurzem Durchmischen mit einem Vortex-Mixer und mehrmaligem Invertieren wurden die Proben im Szintillationszähler vermessen.

## 2 ERGEBNISSE

---

Um ein *In-vitro*-Modell, das die Transporteigenschaften proximaler Tubuluszellen widerspiegelt zu etablieren, musste zunächst ein geeignetes Zellsystem identifiziert werden. Da isolierte primäre Nierenzellen am ehesten die physiologische Situation widerspiegeln, wurden diese Zellen als bevorzugtes Basissystem in Betracht gezogen. Als Modellorganismus wurde auf die Ratte zurückgegriffen, da die Niere der Ratte relativ leicht zugänglich und zudem in Ratten auch präklinische *In-vivo*-Charakterisierungen von Arzneistoffkandidaten durchgeführt werden, wodurch eine spätere *In-vitro-in-vivo*-Korrelation (IVIVC) ermöglicht wird. Daher wurde zunächst eine geeignete Methode zur Isolation und Kultivierung primärer proximaler Tubuluszellen aus der Rattenniere (*Primary rat proximal tubular cells*, PRPTCs) etabliert. Da aber auch der Affe häufig für präklinische pharmakokinetische Studien herangezogen wird, wurden auch primäre proximale Tubuluszellen aus der Affenniere (*Primary monkey proximal tubular cells*, PMPTCs) gewonnen. Nach erfolgreicher Methodenetablierung wurden die primären Nierenzellen parallel zu verschiedenen immortalisierten Nierenzelllinien im Hinblick auf ihre Eignung als *In-vitro*-Nierenzellmodell charakterisiert. Zunächst wurde die Expression verschiedener Zell-Differenzierungsmarker untersucht, um festzustellen, inwiefern sich eine spezifische Differenzierung in proximale Tubuli wiederspiegelt. Danach erfolgte die Evaluierung der Barriereigenschaften mittels Expressionsanalyse von *Tight-Junction*-Proteinen, sowie durch funktionelle Studien zur Dichtigkeit der Zell-Monolayer. Im nächsten Schritt wurden schließlich die Transporteigenschaften der Zellen analysiert. Dazu wurden sowohl die mRNA-Expressionsprofile einiger klinisch relevanter Transporter untersucht, als auch funktionelle Transportstudien durchgeführt. Abschließend erfolgten Versuche zur Regulation der Transporter-Expression in den primären Nierenzellen.

### 2.1 ISOLATION UND KULTIVIERUNG PRIMÄRER PROXIMALER TUBULUSZELLEN

In der Literatur sind unterschiedliche Methoden zur Isolation und Kultivierung von primären proximalen Tubuluszellen aus der Rattenniere beschrieben. Das Grundprinzip der Isolation beruht stets auf einem Kollagenase-Verdau mit anschließender Filtration, jedoch unterscheiden sich die Methoden hinsichtlich der einzelnen durchgeführten Schritte beziehungsweise der einzelnen Parameter, wie etwa dem eingesetzten Verdauungsenzym. Tabelle 2-1 zeigt eine Übersicht über die Isolations- und Kultivierungsmethoden. Angegeben ist die für die einzelnen Schritte der Isolation in unterschiedlichen Publikationen angegebene Bandbreite der Parameter (Spalte „Literaturangaben“). Beispielsweise wird in einigen Publikationen eine Durchflussrate während der Perfusion von 5 ml/min angegeben, während in anderen Publikationen eine Durchflussrate von 10 ml/min verwendet wurde.

Um eine geeignete Isolationsmethode zu identifizieren, wurden Isolationen mit variierenden Parametern durchgeführt und bezüglich der Zellausbeute und Zellvitalität verglichen. Die höchste Zellausbeute und Zellvitalität wurde mit den in Tabelle 2-1 angegebenen Bedingungen erzielt, welche in einer Arbeit von Schaaf *et al.* beschrieben sind (Schaaf *et al.*, 2001). Für die Generierung von primären Nierenzellkulturen wurde daher auf diese Methode zurückgegriffen. Mit Hilfe dieser Isolationsmethode konnten Zellausbeuten von  $22,85 \pm 8,15 \cdot 10^6$  Zellen pro Isolation erreicht werden. Die Vitalität der Zellen betrug im Schnitt  $75,24 \pm 10,81$  %. Nach der Aussaat mit einer Aussaatdichte von  $0,04 \cdot 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> hefteten sich die Zellen nach ca. 24 Stunden auf die Rattenschwanz-Kollagen-beschichteten Zellkulturgefäße an. Die Zellen proliferierten als einschichtiger *Monolayer* und erreichten nach ca. 5 Tagen unter Standardkulturbedingungen schließlich eine Konfluenz von 100 % (siehe auch Kapitel 3.2).

Tabelle 2-1: Übersicht über die Isolationsmethoden zur Isolation primärer proximaler Tubuluszellen.

Parameter		Literaturangaben	angewendet
<b>Perfusion</b>	Art	<i>in situ/ex situ</i>	<i>in situ</i>
	Zugabe von Heparin	ja/nein	ja
	Durchflussrate	5-10 ml/min	7,5 ml/min
	EGTA-Lösung	5-20 min	20 min
	Puffer	0-13 min	4 min
	Kollagenase-Lösung	10-20 min	20 min
<b>Verdauungsenzyme</b>	Kollagenase Typ 1	0,03-0,23 %	-
	Kollagenase Typ 2	0,10-0,13 %	0,13 %
	Kollagenase Typ 4	0,08 %	-
	Zugabe von DNase	0,10 %	-
	Enzym-Mix	verschiedene	-
<b>Filtration</b>	1. Schritt	0-200 µm	100 µm
	2. Schritt	0-90 µm	70 µm
<b>Kulturmedium</b>	+FCS	0-10 %	10 %
<b>Beschichtung</b>	Rattenschwanz-Kollagen	ja/nein	ja
<b>Aussaatdichte</b>		$0,1-1 \times 10^6/\text{cm}^2$	$0,04 \times 10^6/\text{cm}^2$
<b>Kulturdauer</b>		5-9 Tage	5 Tage

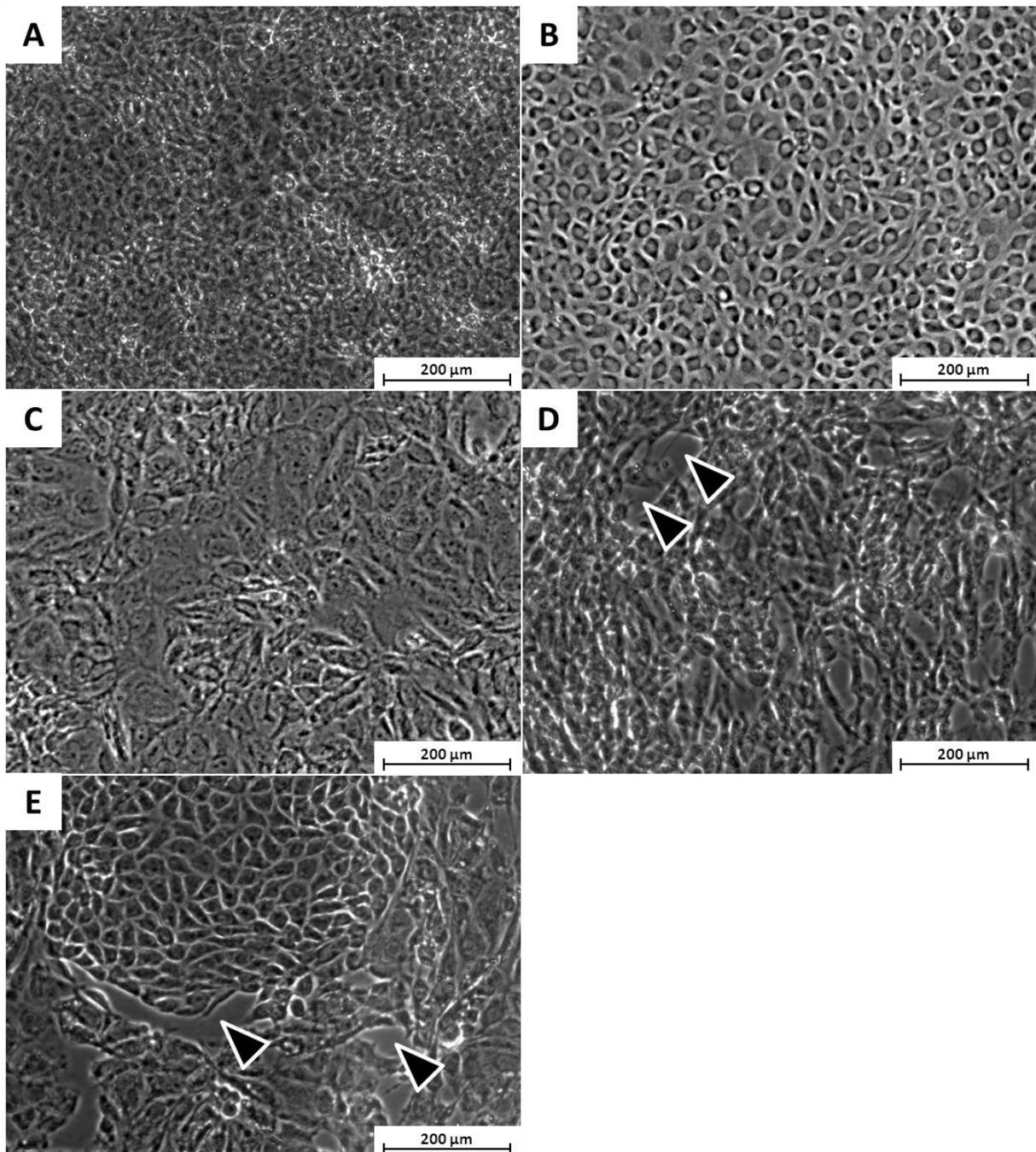
## 2.2 GRUNDLEGENDE MORPHOLOGISCHE UND PHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DER UNTERSUCHTEN ZELLMODELLE

### 2.2.1 Phänotypische Charakterisierung: Zellmorphologie und Integrität der Zell-Monolayer

Zur phänotypischen Untersuchung der kultivierten primären Nierenzellen (PRPTCs und PMPTCs) sowie der Nierenzelllinien MDCKII, NRK-52E, IHKE-1, Caki-1 und RPTEC wurden die jeweiligen Zellen auf Kammer-Objektträger ausgesät und die Zellmorphologie lichtmikroskopisch untersucht.

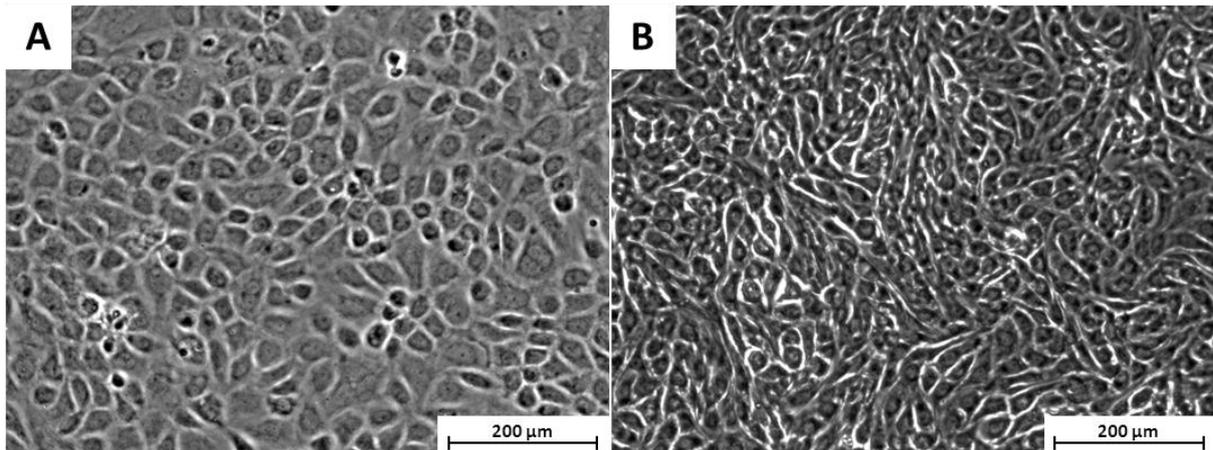
In Abbildung 2-1 und Abbildung 2-2 sind exemplarisch einige lichtmikroskopische Aufnahmen der Nierenzelllinien sowie der primären Nierenzellen aus Ratte und Affe nach 5-tägiger Kultivierung dargestellt. Alle Zellen adhärten nach kurzer Zeit an den Boden der Zellkulturgefäße und begannen einen für Epithelzellen typischen flachen Zellverband zu entwickeln. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass vor allem die primären Nierenzellen, sowie auch MDCKII- und NRK-52E-Zellen, eine für einschichtige Epithelien charakteristische kubische Form annahmen. Im Vergleich dazu war die Zellform der humanen Zelllinien IHKE-1 und Caki-1 eher unregelmäßig und deutlich langgestreckter (Vergleich dazu auch Abbildung 2-9 bis Abbildung 2-13). Die kommerziell erworbene primäre Rattenniere zeigte hingegen eine sehr heterogene Morphologie. Während diese Zellen in einigen Bereichen ein ähnliches Aussehen wie etwa die NRK-52E-Zellen hatten, waren andere Bereiche ungleichmäßiger und ähnelten eher dem der beiden humanen Zelllinien IHKE-1 beziehungsweise Caki-1.

Alle untersuchten Zelllinien, sowie die primären Nierenzellen aus der Ratte und dem Affen bildeten einen charakteristischen gleichmäßigen *Monolayer* aus, der nach spätestens 5 Tagen in Kultur eine Konfluenz von 100 % erreichte. Im Gegensatz dazu bildeten die Caki-1-Zellen und RPTECs unter Standardkulturbedingungen keinen konfluenten *Monolayer* aus. Auch konnte dies nicht über einen verlängerten Kultivierungszeitraum (bis zu 8 Tage) erreicht werden. Es blieben stets große Interzellularräume zwischen den Zellen erhalten (entsprechende Stellen sind in Abbildung 2-1 markiert). Darüber hinaus zeigten die Caki-1-Zellen auch bei sehr engem Zell-Zell-Kontakt keine Kontakthemmung. Anstatt eines einschichtigen Zellrasens bildeten sich zum Teil mehrschichtige Zell-Layer aus.



**Abbildung 2-1: Lichtmikroskopische Aufnahmen der *Monolayer* der verschiedenen Nierenzelllinien.**

A: MDCKII, B: NRK-52E, C: IHKE-1, D: Caki-1, E: RPTEC. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 5 Tage unter Standardbedingungen. Die Zelllinien MDCKII, NRK-52E und IHKE-1 bildeten einen einschichtigen konfluenten *Monolayer* aus. Sowohl die Caki-1-Zelllinie, als auch die RPTECs erreichten unter den gegebenen Kulturbedingungen keine 100 %ige Konfluenz. Die verbleibenden Lücken im Zellrasen sind exemplarisch mit schwarzen Dreiecken markiert. Alle Aufnahmen wurden mit einer 200x-Vergrößerung erstellt.



**Abbildung 2-2: Lichtmikroskopische Aufnahmen der *Monolayer* der primären Nierenzellen.**

A: PRPTCs, B: PMPTCs. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 5 Tage unter Standardbedingungen. Sowohl die Primärzellen aus der Ratte als auch jene aus dem Affen bildeten einen einschichtigen konfluenten *Monolayer* aus. Alle Aufnahmen wurden mit einer 200×-Vergrößerung erstellt.

## 2.2.2 Biochemische Charakterisierung: Expressionsanalyse von proximalen und distalen Tubulusmarkern

Es ist bekannt, dass in der Niere eine starke differenzielle Genregulation stattfindet, das heißt es gibt Gene die ausschließlich in den Zellen der proximalen oder in den Zellen der distalen Tubuli exprimiert werden. Die Expression der entsprechenden Gene kann daher als spezifischer Marker für proximale oder distale Tubuli herangezogen werden. Zur Überprüfung der Identität der isolierten primären Nierenzellen wurde daher sowohl die mRNA- als auch die Protein-Expression verschiedener Differenzierungsmarker untersucht. Um eventuell vorhandene Spezies-spezifische Unterschiede zu berücksichtigen, wurden für die Charakterisierung mehrere in der Literatur beschriebene differenziell regulierte Gene ausgewählt und deren Expression in den verschiedenen Zellen untersucht. Für den Nachweis von proximalen Tubuli wurden Villin 1 (VIL1),  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 (GGT1), Alanin-Aminopeptidase (AN-PEP) und alkaline Phosphatase (ALPL) eingesetzt und als Marker für distale Tubuli wurden die Zellen auf das Vorhandensein von Hexokinase 1 (HK1) überprüft. Der Nachweis der Marker erfolgte auf mRNA-Ebene, für Villin 1 zusätzlich auf Protein-Ebene mittels *Western Blot*-Analyse, sowie für die  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 auch auf funktioneller Ebene mittels eines kolorimetrischen Enzym-Assays.

### 2.2.2.1 Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene mittels qPCR

Zur Untersuchung der mRNA-Expressionslevel der ausgewählten Tubulusmarker wurde aus den frisch isolierten, beziehungsweise aus zuvor in Zellkulturflaschen ausgesäten Zellen, die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA transkribiert (siehe Kapitel 1.7). Diese wurde anschließend mit den entsprechenden Primer-Paaren für die qPCR eingesetzt und quantifiziert (siehe Kapitel 1.7.4). Zur Auswertung wurden die ermittelten  $C_T$ -Werte auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH normalisiert und die relative Expression entweder als  $2^{-(\Delta C_T)} \times 10^3$  oder nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode als  $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ , bezogen auf die frisch isolierten

PRPTCs, angegeben. Alle Expressionsanalysen wurden insgesamt dreimal mit aus unterschiedlichen Zellpassagen beziehungsweise aus unterschiedlichen Primärzell-Isolationen generierter cDNA wiederholt.

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen sind in Tabelle 2-2 und Abbildung 2-3 dargestellt. Wie daraus zu ersehen ist, wird die mRNA der Tubulusmarker in den primären Nierenzellen und in den Nierenzelllinien unterschiedlich stark exprimiert. Generell lässt sich sagen, dass nur in frisch isolierten primären Nierenzellen die mRNA aller proximalen Tubulusmarker in zumindest moderaten Mengen gefunden werden konnte. Die untersuchten Zelllinien NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1 zeigten hingegen jeweils nur minimale Expressionslevel für mindestens einen der proximalen Tubulusmarker.

### ***Expression der Markergene in den Nierenzelllinien***

Von den untersuchten Markerenzymen wurde in allen Zelllinien das im Bürstensaumepithel vorkommende Enzym Alanin-Amino-peptidase am stärksten exprimiert. Die Caki-1-Zellen zeigten das höchste Expressionslevel für die Alanin-Amino-peptidase, gefolgt von den NRK-52E- und IHKE-1-Zellen. In den NRK-52E-Zellen wurde die zweithöchste Expression für  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 beobachtet. Alle anderen untersuchten Tubulusezyme waren in dieser Zelllinie nur in sehr geringem Maße nachweisbar. Die beiden humanen Zelllinien IHKE-1 und Caki-1 zeigten, mit Ausnahme der Alanin-Amino-peptidase, für alle Tubulusmarker nur eine sehr geringe oder keine mRNA-Expression (im Falle der alkalinen Phosphatase in den Caki-1-Zellen). Stattdessen konnte in diesen beiden Zelllinien eine relativ hohe Expression des distalen Tubulusenzym Hexokinase 1 gemessen werden. Dieses Expressionsverhalten spiegelt möglicherweise eine Redifferenzierung zu einem distalen Zelltypus wider.

### ***Expression der Markergene in frisch isolierten primären Nierenzellen***

Das höchste Expressionslevel wurde in den frisch isolierten PRPTCs, wie auch bei den Nierenzelllinien, für die Alanin-Amino-peptidase gefunden. Im Vergleich zu den Zelllinien war die Menge an Alanin-Amino-peptidase allerdings etwa 10–29-fach höher. Die zweithöchste Expression wurde in den frisch isolierten PRPTCs für  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 beobachtet, wobei die Expression etwa 21-fach höher als in den NRK-52E-Zellen war. Auch für ein weiteres typisches Gen aus dem Bürstensaum-Epithel, für die alkaline Phosphatase, zeigte sich das mit Abstand höchste Expressionslevel in den frisch isolierten PRPTCs. Dieses lag um mindestens eine Größenordnung höher als in den Zelllinien. Ein ähnliches Expressionsprofil zeigte auch das Gen für das Actin-bindende Protein Villin 1, ein weiteres typisches Protein aus dem Bürstensaum-Epithel. Moderate Mengen an Villin 1 konnten lediglich in den frisch isolierten PRPTCs nachgewiesen werden. In den Zelllinien wurden hingegen nur minimale Mengen gefunden (NRK-52E) oder es konnte keine Expression nachgewiesen werden (IHKE-1 und Caki-1). Die als Marker für distale Tubuli verwendete Hexokinase 1 konnte in den frisch isolierten PRPTCs nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden.

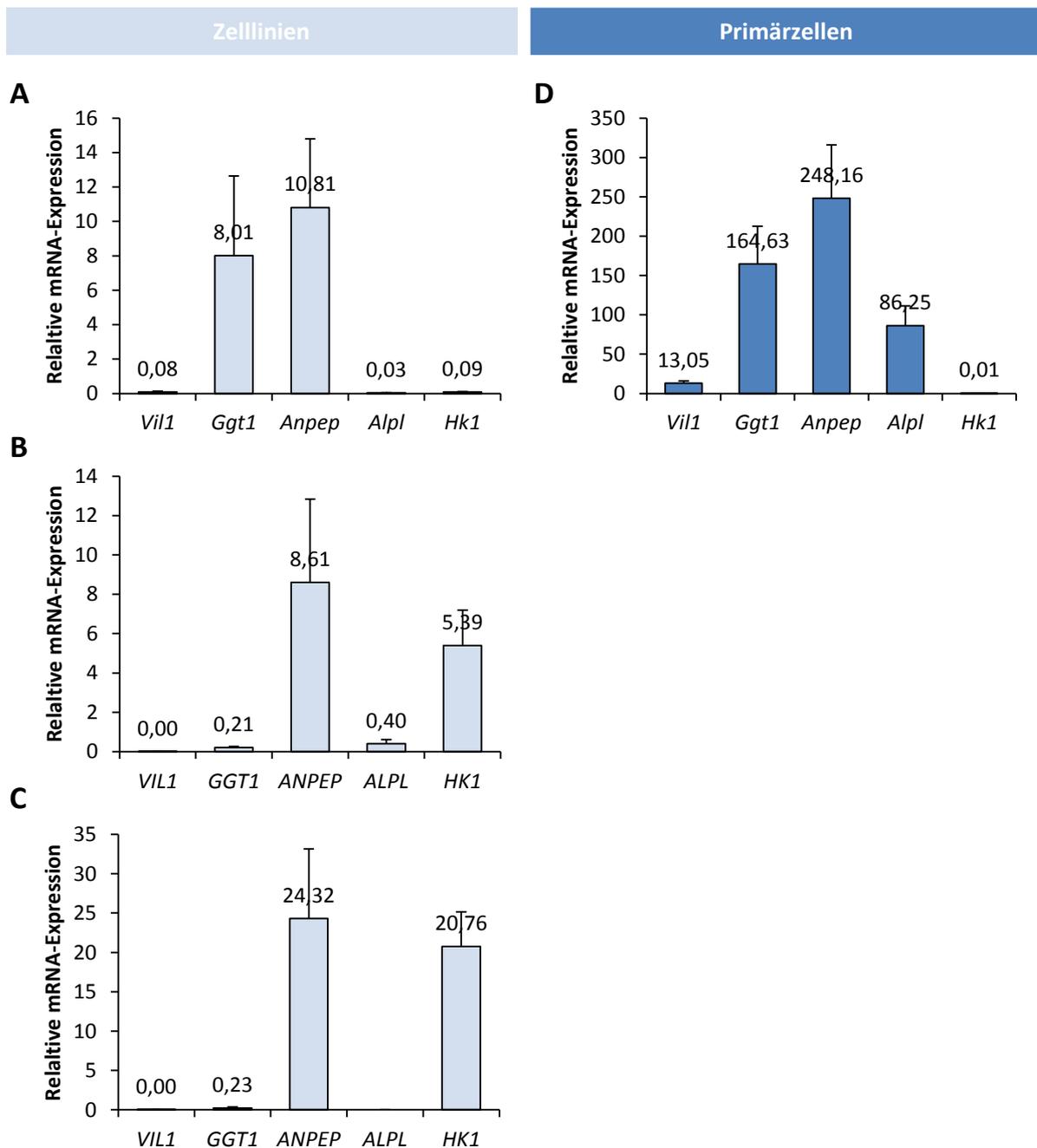
### Expression der Markergene in kultivierten primären Nierenzellen

Zusätzlich zu frisch isolierten primären Nierenzellen wurden auch 5 Tage kultivierte primäre Nierenzellen hinsichtlich ihrer Tubulusmarker analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 2-4 dargestellt. Wie sich aus der Graphik klar erkennen lässt, geht die Expression verschiedener Tubulusmarker nach mehrtägiger Kultivierung drastisch zurück, möglicherweise aufgrund einer Dedifferenzierung. Die stärkste Verringerung wurde in der Expression der alkalinen Phosphatase (ca. 900-fach verringert), die geringste Verringerung in der Expression von Villin 1 (ca. 25-fach verringert) gefunden. Im Gegensatz dazu konnte für den distalen Tubuli-Marker Hexokinase 1 eine 1,8-fache Erhöhung der Expression gemessen werden.

**Tabelle 2-2: Übersicht über die relative mRNA-Expression der untersuchten Tubulusmarker in den Nierenzelllinien und frisch isolierten primären Nierenzellen.**

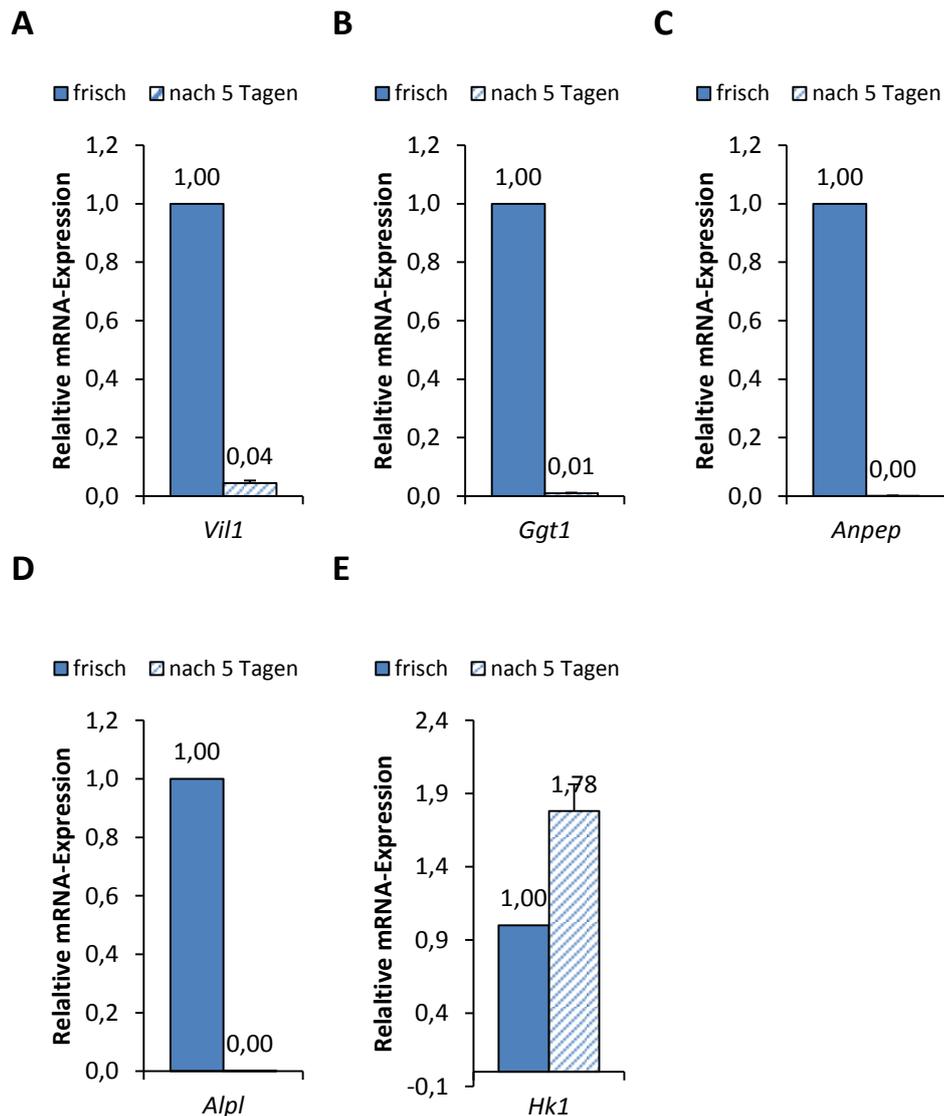
Region	Name	Gen	Zelllinien			Primärzellen
			NRK-52E	IHKE-1	Caki-1	PRPTC
proximal	<b>VIL1</b>	<i>VIL1/Vil1</i>	0,08	0,00	0,00	13,05
	<b>GGT1</b>	<i>GG1/Ggt1</i>	8,01	0,21	0,23	164,43
	<b>ANPEP</b>	<i>APEP/Apep</i>	10,81	8,61	24,32	248,16
	<b>ALPL</b>	<i>ALPL/Alpl</i>	0,03	0,40	< NG	86,25
distal	<b>HK1</b>	<i>HK1/Hk1</i>	0,09	5,39	20,76	0,01

VIL1: Villin 1, GGT1:  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1, ANPEP: Alanin-Aminopeptidase, ALPL: Alkaline Phosphatase, HK1: Hexokinase 1. Expressionsstärke: niedrig  hoch



**Abbildung 2-3: Relative mRNA-Expression der untersuchten Tubulusmarker in den Nierenzelllinien (A-C) und frisch isolierten primären Nierenzellen (D).**

Die mRNA-Expressionen wurden auf die *GAPDH/Gapdh*-Expression in der jeweiligen Probe normalisiert und ist als  $2^{-(\Delta C_T)} \times 10^3$  angegeben. A: NRK-5E, B: IHKE-1, C: Caki-1, D: frisch isolierte PRPTCs. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. Ist kein Wert angegeben befand sich die Expression unterhalb der Nachweisgrenze. VIL1: Villin 1, GGT1:  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1, ANPEP: Alanin-Aminopeptidase, ALPL: Alkaline Phosphatase, HK1: Hexokinase 1.



**Abbildung 2-4: Relative mRNA-Expression der untersuchten Tubulusmarker in frisch isolierten und 5 Tage kultivierten primären Nierenzellen.**

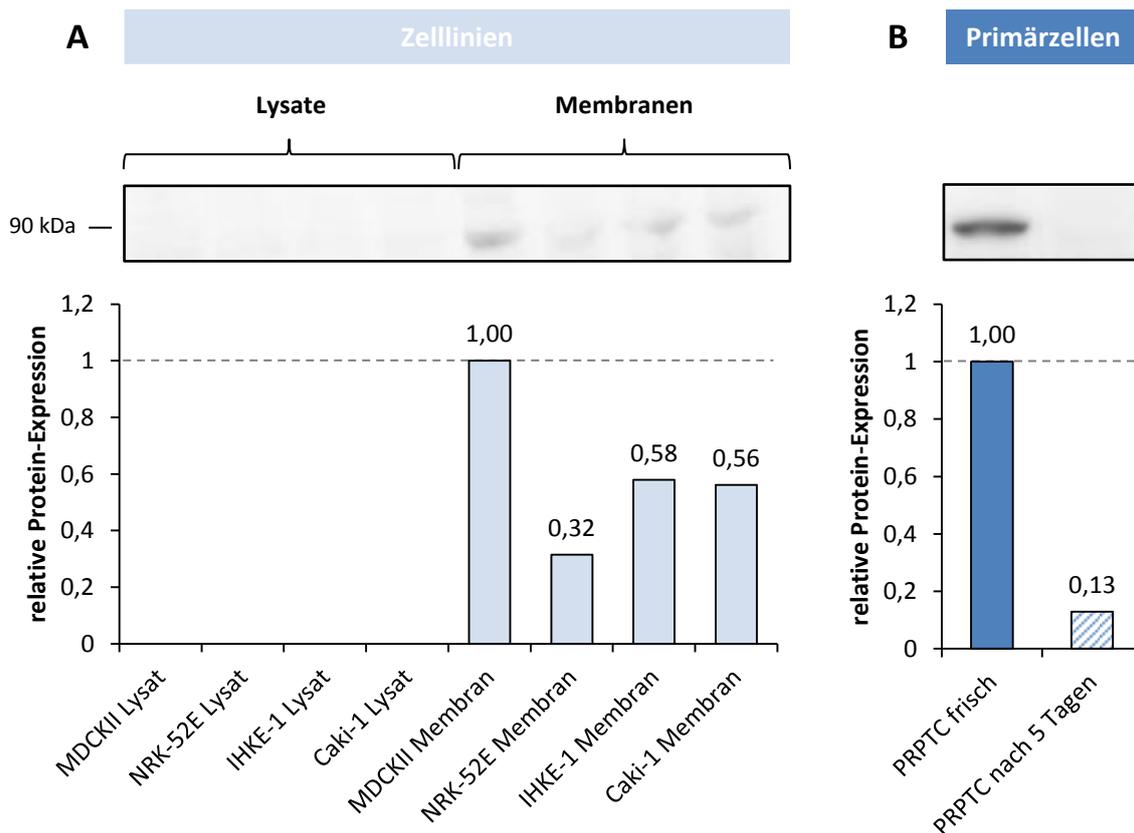
Die mRNA-Expressionen wurden auf die *Gapdh*-Expression in der jeweiligen Probe normalisiert und auf die Expressionsstärke in den frisch isolierten PRPTCs bezogen (relative mRNA-Expression = 1). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. A: Villin 1, B:  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1, C: Alanin-Aminopeptidase, D: Alkaline Phosphatase, E: Hexokinase 1.

### 2.2.2.2 Expressionsanalyse auf Protein-Ebene mittels Western Blot

Um zu überprüfen, ob sich die mRNA-Expressionsprofile auch auf Protein-Ebene widerspiegeln, wurde exemplarisch für den proximalen Tubulusmarker Villin 1 eine *Western Blot*-Analyse durchgeführt. Dazu wurden Zellysate von den frisch isolierten primären Nierenzellen, sowie von den unterschiedlichen Nierenzelllinien gewonnen. Zusätzlich zu den Gesamtzellysaten wurden auch Lysate von Membranfraktionen aus den Nierenzelllinien hergestellt. Alle Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und im *Western Blot* analysiert (siehe Kapitel 1.8.2 und 1.8.3). Der spezifische Nachweis von Villin 1

erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen anti-Villin 1-Primärantikörpers (H-60). Die immunreaktiven Banden wurden densitometrisch ausgewertet und auf den Gesamtproteingehalt der jeweiligen Probe normalisiert. Die normalisierten Expressionsintensitäten wurden im Falle der Zelllinien in Relation zu der normalisierten Villin 1-Expression in MDCKII-Zellen und im Falle der primären Nierenzellen in Relation zur normalisierten Villin 1-Expression in frisch isolierten PRPTCs gesetzt.

Die Ergebnisse eines exemplarischen *Western Blots* sind in Abbildung 2-5 dargestellt. Sowohl in den Lysaten der frisch isolierten PRPTCs, als auch in aufgereinigten Membranfraktionen, die aus den Zelllinien gewonnen wurden, sind immunreaktive Banden im erwarteten Molekulargewichtsbereich von etwa 90 kDa zu erkennen, jedoch in unterschiedlicher Intensität. Ein starkes immunreaktives Signal konnte in den frisch isolierten PRPTCs nachgewiesen werden, nur relativ schwache Signale wurden hingegen in den aufgereinigten Membranfraktionen der Zelllinien gefunden. In den Zelllysaten war keine immunreaktive Bande im erwarteten Molekulargewichtsbereich detektierbar. Das stärkste Villin-spezifische Signal war in den Membranfraktionen der MDCKII-Zellen nachweisbar, in den Membranfraktionen der anderen Zelllinien zeigten sich im Vergleich zu den MDCKII-Zellen deutlich schwächere Signale. Mittels Densitometrie konnte in den NRK-52E-Membranfraktionen etwa 30 % und in den Membranfraktionen aus IHKE-1 und Caki-1-Zellen etwa 60 % der in den MDCKII-Zellen gemessenen Villin-Signalstärke gemessen werden. Während in den frisch isolierten PRPTCs eine im Vergleich zu den Zelllinien deutlich stärkere Villin 1-Expression nachgewiesen werden konnte, war die Expression in 5 Tage kultivierten PRPTCs nur noch minimal. So konnte nach 5 Tagen in Kultur nur noch eine Bandenintensität von 13 % gegenüber den frisch isolierten PRPTCs gemessen werden, was mit den Ergebnissen der mRNA-Expressionsanalyse korreliert und auf eine Dedifferenzierung der Zellen unter Kulturbedingungen hinweist.



**Abbildung 2-5: Western Blot des Expressionsprofils von Villin 1 (VIL1) in den untersuchten Nierenzelllinien und primären Nierenzellen.**

Dargestellt ist ein *Western Blot* der Zelllysate und Membranfraktionen von MDCKII, NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1-Zellen (A) sowie der Zelllysate aus frisch isolierten sowie kultivierten PRPTCs (B). Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. Aufgetragen wurden je 50 µg Protein, Primärantikörper: Kaninchen-anti-Villin 1 (H-60) (1:200), Sekundärantikörper: anti-Kaninchen-IgG-HRP (1:5000). Die Protein-Expression wurde auf den Gesamtproteingehalt pro Probe normalisiert und die relativen Protein-Expressionen auf die MDCKII-Membranfraktion (A) beziehungsweise auf frisch isolierte PRPTCs (B) bezogen.

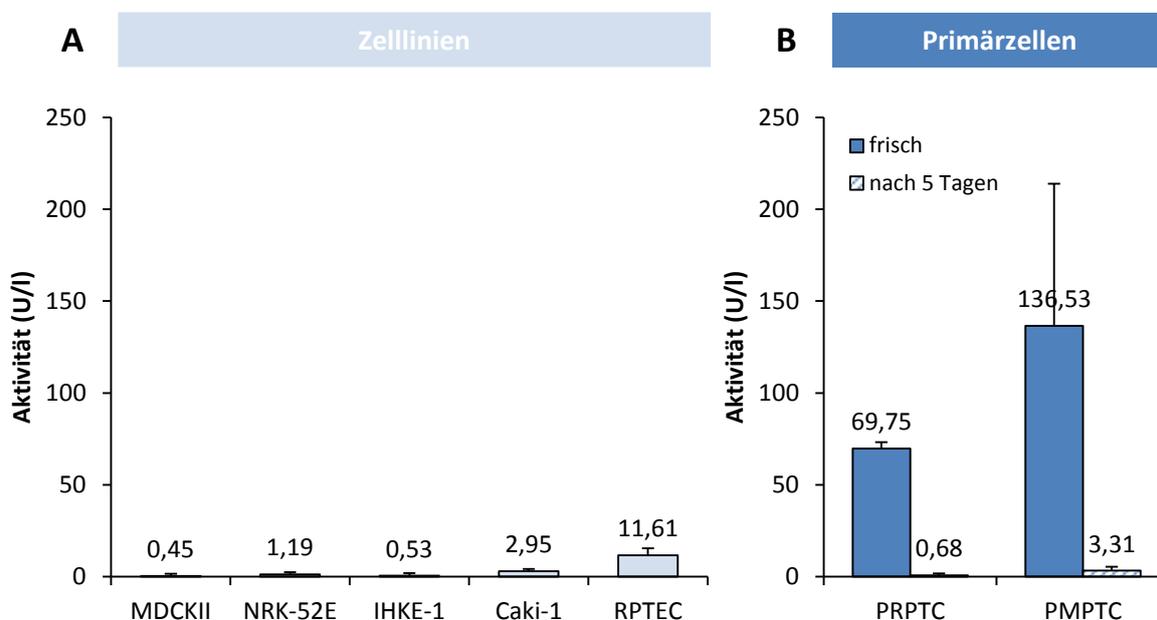
### 2.2.2.3 Funktionelle Studien zum Nachweis der $\gamma$ -Glutamyltransferase 1

Zum funktionellen Nachweis von proximalen Tubuluszellen wurde die Aktivität des Tubulusmarkers  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 in den verschiedenen Zelllysaten durch einen kolorimetrischen Assay im 96-Loch-Mikrotiterplatten-Format bestimmt (siehe Kapitel 1.8.5). Zusätzlich zu den PRPTCs konnten für diesen Versuch auch aus dem Affen isolierte PMPTCs sowie die RPTEC-Zelllinie untersucht werden.

Abbildung 2-6 zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen der  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Aktivität des Enzyms in allen untersuchten kultivierten Zellen im Vergleich zu den frisch isolierten primären Nierenzellen sehr niedrig ist. Während diese Aktivitäten von  $69,75 \pm 3,39$  U/l für PRPTCs und  $136,53 \pm 77,34$  U/l für PMPTCs zeigten, konnten bei den Zelllinien nur maximale Aktivitäten von  $11,6 \pm 3,90$  U/l (RPTEC) gemessen werden.

Weiterhin fällt auf, dass die Aktivität in den primären Nierenzellen während der Kultivierungsperiode sehr stark zurückgeht. Auch hier korrelieren die funktionellen Messungen mit den Ergebnissen der

mRNA-Expressionsanalyse. PRPTCs verlieren nach 5 Tagen Kultur 99,0 % ihrer Aktivität ( $0,68 \pm 1,10$  U/l versus  $69,75 \pm 3,39$  U/l), im Falle der PMPTCs sind es immerhin 97,6 % ( $3,31 \pm 2,02$  U/l versus  $136,53 \pm 77,34$  U/l). Die Aktivität in den 5 Tage kultivierten primären Nierenzellen ist also vergleichbar mit der GGT1-Aktivität der Zelllinien MDCKII, NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1.



**Abbildung 2-6: Enzymaktivität der  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 (GGT1) in den untersuchten Nierenzelllinien und primären Nierenzellen.**

Dargestellt sind die Enzymaktivitäten von Zelllysaten aus MDCKII-, NRK-52E-, IHKE-1-, Caki-1- und RPTE-Zellen (A) sowie von frisch isolierten und kultivierten PRPTCs beziehungsweise PMPTCs (B). Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. Es wurde die Menge an umgesetztem p-Nitroanilin (pNA) durch Messen der Absorption bei 405 nm bestimmt. Die Inkubation mit  $\gamma$ -Glutamyl-p-Nitroanilid (6 mM) + Glycylglycin (80 mM) erfolgte für 10 min. Eingesetzt wurden je 1  $\mu$ g Proteinlysate. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 2-5 unabhängigen Versuchen.

### 2.3 BARRIEREEIGENSCHAFTEN DER UNTERSUCHTEN ZELLMODELLE

Um zu klären, inwieweit die untersuchten Zellen die Eigenschaften der proximalen Tubuli *in vivo* widerspiegeln sind auch die Barriereigenschaften der Zellen von entscheidender Bedeutung. Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, wurde die Dichtigkeit der Zell-Monolayer untersucht, welche wesentlich durch die *Tight Junctions* bestimmt wird. Es ist bekannt, dass die gewebetypische Zusammensetzung eines spezifischen Sets von Membranproteinen entscheidend für die Permeationseigenschaften der *Tight Junctions* ist (Furuse *et al.*, 2001). Neben den beiden essentiellen *Tight-Junction*-Proteinen *Tight Junction Protein 1* (TJP1) und Occludin (OCLN) sind in der Literatur einige für die proximalen Tubuli typische Vertreter der Claudine beschrieben (siehe Kapitel 1.2.1). Basierend auf den Literaturdaten wurden Claudin-2 (CLDN2), Claudin-7 (CLDN7), sowie Claudin-10 (CLDN10) ausgewählt und deren Ex-

pression in den verschiedenen Nierenzelllinien und primären Nierenzellen mittels qPCR und Immunfluoreszenz auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht. Die Expressionsergebnisse wurden mit den gemessenen transepithelialen Widerständen (TEER) sowie mit Ergebnissen von bidirektionalen Transportversuchen korreliert, um die Barriereigenschaften der untersuchten Zellen zu beurteilen.

### 2.3.1 Biochemische Charakterisierung: Expressionsanalyse von *Tight-Junction*-Proteinen

#### 2.3.1.1 Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene mittels qPCR

Die Quantifizierung der mRNA der untersuchten *Tight-Junction*-Proteine erfolgte analog zur Expressionsanalyse der Tubulusmarker (siehe Kapitel 2.2.2.1). In Tabelle 2-3 und Abbildung 2-7 sind die relativen Expressionsstärken von TJP1, Occludin, Claudin-2, Claudin-7 und Claudin-10 in den verschiedenen Zellen dargestellt. Daraus geht hervor, dass die untersuchten *Tight-Junction*-Proteine in den verschiedenen Zellen ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen.

#### *Expression der Tight-Junction-Proteine in den Nierenzelllinien*

In allen untersuchten Zelllinien wurde das mit Abstand höchste Expressionslevel für TJP1 beobachtet. Occludin konnte, in geringerer Menge, ebenfalls in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei fiel die Expression in den NRK-52E-Zellen etwas höher aus als in den Zelllinien humanen Ursprungs (IHKE-1 und Caki-1). Die Expression der Claudine war in den untersuchten Zelllinien generell niedrig. Lediglich in den IHKE-1-Zellen konnte Claudin-10 in moderaten Mengen nachgewiesen werden.

#### *Expression der Tight-Junction-Proteine in frisch isolierten primären Nierenzellen*

Claudin-10 konnte in den frisch isolierten primären Nierenzellen am stärksten nachgewiesen werden. Auch Claudin-7 wurde in moderaten Mengen gefunden. Die geringste mRNA-Expression wurde für Claudin-2 beobachtet. Das Expressionslevel von Occludin war in etwa so hoch wie in den Zelllinien. Auffällig war im Vergleich zu den Zelllinien die geringe Menge von TJP1-mRNA.

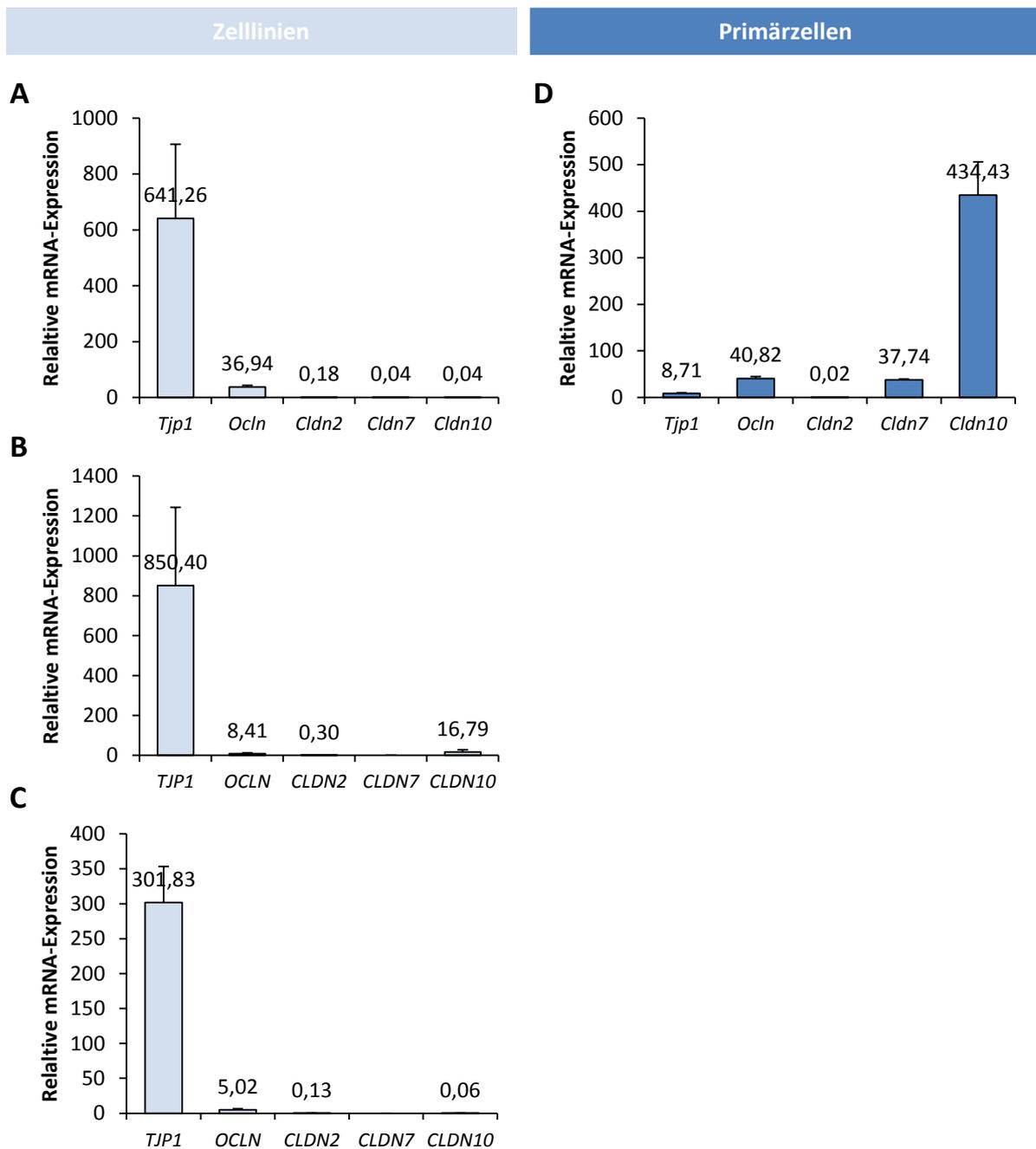
Tabelle 2-3: Übersicht über die relative mRNA-Expression der untersuchten *Tight-Junction*-Proteine in den Nierenzelllinien und frisch isolierten primären Nierenzellen.

Name	Gen	Zelllinien			Primärzellen
		NRK-52E	IHKE-1	Caki-1	PRPTC
TJP1	<i>TJP1/Tjp1</i>	641,26	850,40	301,83	8,71
OCLN	<i>OCLN/Ocln</i>	36,94	8,41	5,02	40,82
CLDN2	<i>CLDN2/Cldn2</i>	0,18	0,30	0,13	0,02
CLDN7	<i>CLDN7/Cldn7</i>	0,04	< NG	< NG	37,74
CLDN10	<i>CLDN10/Cldn10</i>	0,04	16,79	0,06	434,43

TJP1: *Tight Junction* Protein 1, OCLN: Occludin, CLDN2: Claudin-2, CLDN7: Claudin-7, CLDN10: Claudin-10. Expressionsstärke: niedrig  hoch

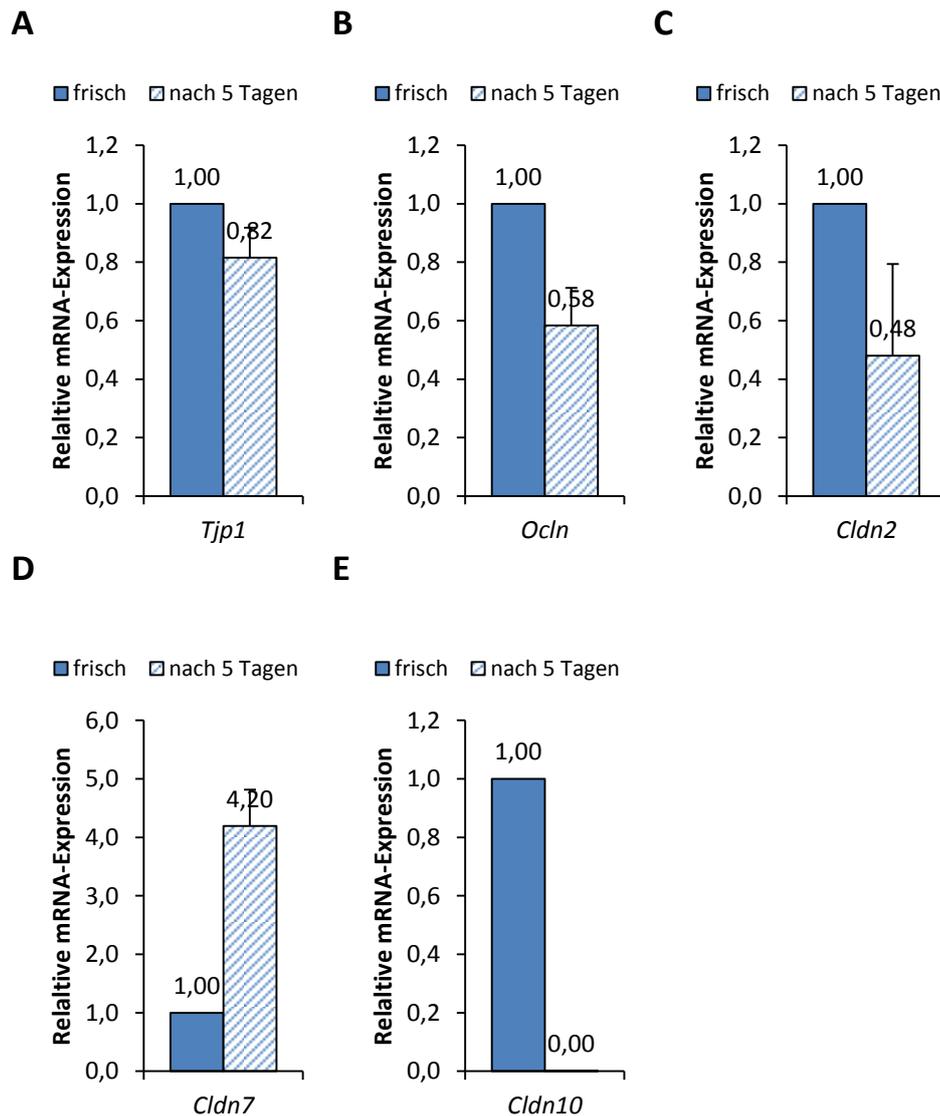
***Expression der Tight-Junction-Proteine in kultivierten primären Nierenzellen***

Die Expression der untersuchten *Tight-Junction*-Proteine wurde auch in den für 5 Tage kultivierten PRPTCs untersucht. Abbildung 2-8 zeigt die Expressionsunterschiede zwischen PRPTCs vor und nach einer 5-tägigen Kultivierungsperiode. Die Expressionsstärke in frisch isolierten PRPTCs wurde dabei als Bezugspunkt verwendet. Während sich das Expressionslevel von TJP1, Occludin und Claudin-2 nach mehrtägiger Kultivierung nur leicht bis moderat verringerte, war das Expressionsverhalten von Claudin-7 und Claudin-10 deutlich verändert. Während für Claudin-7 ein 4-facher Anstieg der Expression gemessen werden konnte, war für Claudin-10 ein fast kompletter Rückgang der Expression in den kultivierten PRPTCs zu beobachten (ca. 700-fach verringert).



**Abbildung 2-7: Relative mRNA-Expression der untersuchten Tight-Junction-Proteine in den Nierenzelllinien (A-C) und frisch isolierten primären Nierenzellen (D).**

Die mRNA-Expressionen wurden auf die *GAPDH/Gapdh*-Expression in der jeweiligen Probe normalisiert und ist als  $2^{-(\Delta C_T)} \times 10^3$  angegeben. A: NRK-5E, B: IHKE-1, C: Caki-1, D: frisch isolierte PRPTCs. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. Ist kein Wert angegeben befand sich die Expression unterhalb der Nachweisgrenze. TJP1: *Tight Junction Protein 1*, OCLN: *Occludin*, CLDN2: *Claudin-2*, CLDN7: *Claudin-7*, CLDN10: *Claudin-10*.



**Abbildung 2-8: Relative mRNA-Expression der untersuchten *Tight-Junction*-Proteine in frisch isolierten und 5 Tage kultivierten primären Nierenzellen.**

Die mRNA-Expressionen wurden auf die *Gapdh*-Expression in der jeweiligen Probe normalisiert und auf die Expressionsstärke in den frisch isolierten PRPTCs bezogen (relative mRNA-Expression = 1). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. A: *Tight Junction* Protein 1, B: Occludin, C: Claudin-2, D: Claudin-7, E: Claudin-10.

### 2.3.1.2 Expressionsanalyse auf Protein-Ebene mittels Immunfluoreszenz

Zur weiteren Charakterisierung der *Tight-Junction*-Proteinexpression, sowie zur Validierung der mRNA-Expressionsdaten wurden Immunfluoreszenzfärbungen an intakten Zellen durchgeführt. Da für die Integrität der *Tight Junctions* eine Lokalisierung der beteiligten Proteine an den Zell-Zell-Kontakten notwendig ist, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, die eine genaue intrazelluläre Lokalisierung der untersuchten *Tight-Junction*-Proteine erlauben und somit einen Rückschluss auf die Funktionsfähigkeit der *Tight Junctions* zulassen.

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden wie in Kapitel 1.8.4 beschrieben durchgeführt um die Expressionsprofile der *Tight-Junction*-Proteine TJP1, Occludin, Claudin-2, Claudin-7 und Claudin-10 mit Hilfe der entsprechenden Antikörper zu untersuchen (verwendete Antikörper siehe Bildunterschriften). Parallel wurden alle Zellen zur Visualisierung der Zellkerne auch mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. In Abbildung 2-9 bis Abbildung 2-13 sind einige repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen dargestellt. Alle Aufnahmen wurden unter den in Kapitel 1.8.4 beschriebenen Bedingungen angefertigt und die einzelnen Kanäle mit der *AxioVision*-Software eingefärbt und überlagert.

Wie aus den Bildern klar hervorgeht, sind die *Tight-Junction*-Proteine in den kultivierten Nierenzellen sehr heterogen lokalisiert. So konnte in den MDCKII-Zellen für jedes der untersuchten Proteine ein Signal detektiert werden, welches gleichmäßig über den gesamten *Monolayer* verteilt war. Die stärkste Expression aller *Tight-Junction*-Proteine war im Bereich der Zell-Zell-Kontakte erkennbar (siehe Abbildung 2-9). Ein etwas anderes Bild ergab sich im Falle der NRK-52E-Zellen, bei denen lediglich TJP1 und Occludin mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden konnten. Auch hier war das Signal jeweils am deutlichsten an den Zell-Zell-Kontakten zu erkennen und über den gesamten *Monolayer* verteilt, wobei das Signal für Occludin insgesamt recht schwach ausfiel (siehe Abbildung 2-10). Bei den IHKE-1-Zellen konnte ein positives Signal für TJP1 und Occludin sowie für Claudin-2, nicht jedoch für Claudin-7 detektiert werden. Für TJP1 und Occludin war neben diffusen Färbungen im Bereich des Cytosols ein deutliches Signal an den Zell-Zell-Kontakten zu sehen. Dieses war jedoch stellenweise unterbrochen und umfasste zum Teil nicht den gesamten Bereich zwischen den Zellen (siehe Abbildung 2-11). Für Claudin-2 ließ sich lediglich ein granulöses Signal, hauptsächlich im Bereich nahe der Zellkerne, erkennen, der Nachweis eines deutlichen Fluoreszenzsignals zwischen den Zellen blieb aus. Zudem war das Signal nur in einigen Zellen zu finden, während in vielen Zellen kein Signal detektiert werden konnte. Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei der Untersuchung der Caki-1-Zellen ab. Färbungen mit anti-TJP1-, anti-Occludin- und anti-Claudin-2-Antikörpern brachten zwar ein Signal hervor, allerdings erwies sich dieses in allen Fällen hauptsächlich als diffus über die Zellen verteilt und war in noch stärkerem Maße als bei den IHKE-1-Zellen nur in wenigen Zellen an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (siehe Abbildung 2-12). Für Claudin-7 konnte, wie bereits bei den NRK-52E und IHKE-1 Zellen, kein Signal detektiert werden. Bei den RPTECs konnte für alle Proteine ein Fluoreszenz-Signal detektiert werden (siehe Abbildung 2-13). Die Verteilung der Signale war jedoch, analog zu der heterogenen Morphologie der Zellen (siehe Kapitel 2.2.1) sehr ungleichmäßig über den *Monolayer* verteilt. Neben Bereichen, in denen eine Färbung zu sehen war, blieben andere Bereiche des *Monolayers* ungefärbt. Im Fall von TJP1 war neben einer deutlichen Färbung an den Zell-Zell-Kontakten auch ein Signal im Cytosol erkennbar. Ähnliches zeigte sich für Occludin. Bei Färbungen mit Claudin-2-Antikörper konnte ein Signal, wie bereits bei den PMPTCs, lediglich im Bereich des Cytosols der Zellen detektiert werden. Für Claudin-7 zeigte sich in

einigen Arealen eine deutliche Färbung an den Zell-Zell-Kontakten, während in weiten Bereichen des *Monolayers* keine entsprechende Färbung nachgewiesen werden konnte. Als einzige der untersuchten Zellen zeigten die RPTECs auch ein Signal für Claudin-10, welches jedoch zum überwiegenden Teil im Cytosol und nur in einigen Bereichen als schwaches Signal an den Zell-Zell-Kontakten erkennbar war.

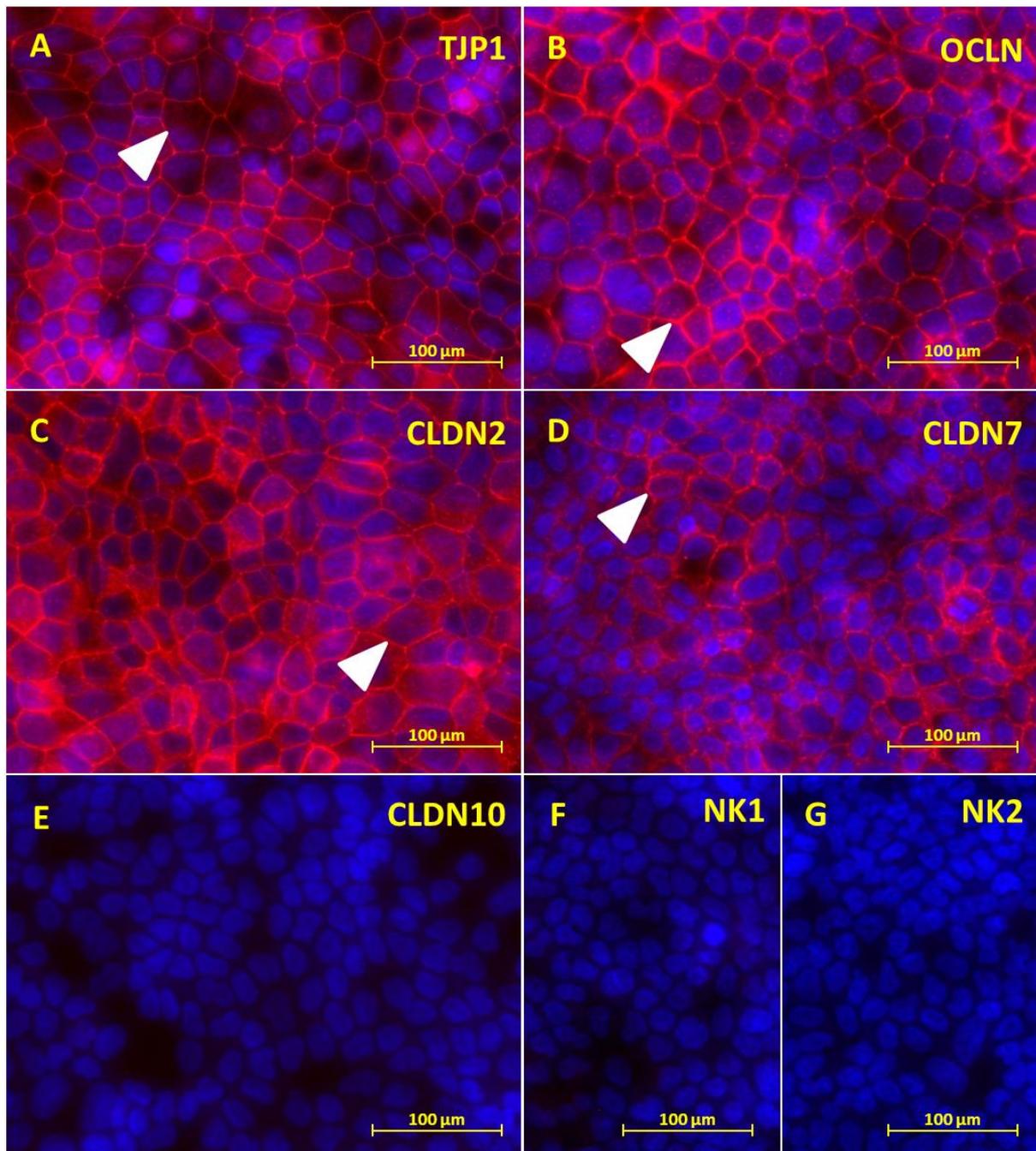
Die primären Nierenzellen PRPTC und PMPTC zeigten ein einander ähnliches Expressionsprofil der untersuchten *Tight-Junction*-Proteine. In beiden Fällen war das Signal der TJP1-, Occludin-, und Claudin-7-Färbungen recht deutlich und auf die Zell-Zell-Kontakte beschränkt (siehe Abbildung 2-14 und Abbildung 2-15). Nur im Fall von Claudin-2 unterschieden sich die Expressionsmuster von PRPTCs und PMPTCs, ein Signal wurde hier ausschließlich bei den PMPTCs gefunden. Allerdings ähnelte das Bild dem bei den IHKE-1- beziehungsweise Caki-1-Zellen für Claudin-2 gefundenem und erschien granulös und auf den Bereich des Cytosols beschränkt (siehe Abbildung 2-15).

Zur besseren Übersichtlichkeit ist in Tabelle 2-4 eine Zusammenfassung der Expressionsprofile der *Tight-Junction*-Proteine in den untersuchten Zellen dargestellt. Beim Vergleich der Ergebnisse mit den mRNA-Expressionsprofilen (siehe Kapitel 2.3.1.1) zeigte sich ein uneinheitliches Bild. Im Falle von TJP1 und Occludin stimmen die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen qualitativ mit denen der mRNA-Analyse überein, jedoch konnte für die Claudine-2, -7 und -10 keine Proteinexpression nachgewiesen werden, obwohl eine mRNA-Expression der entsprechenden Gene vorhanden war.

**Tabelle 2-4: Übersicht über die Expression der untersuchten *Tight-Junction*-Proteine in den Nierenzelllinien und kultivierten primären Nierenzellen.**

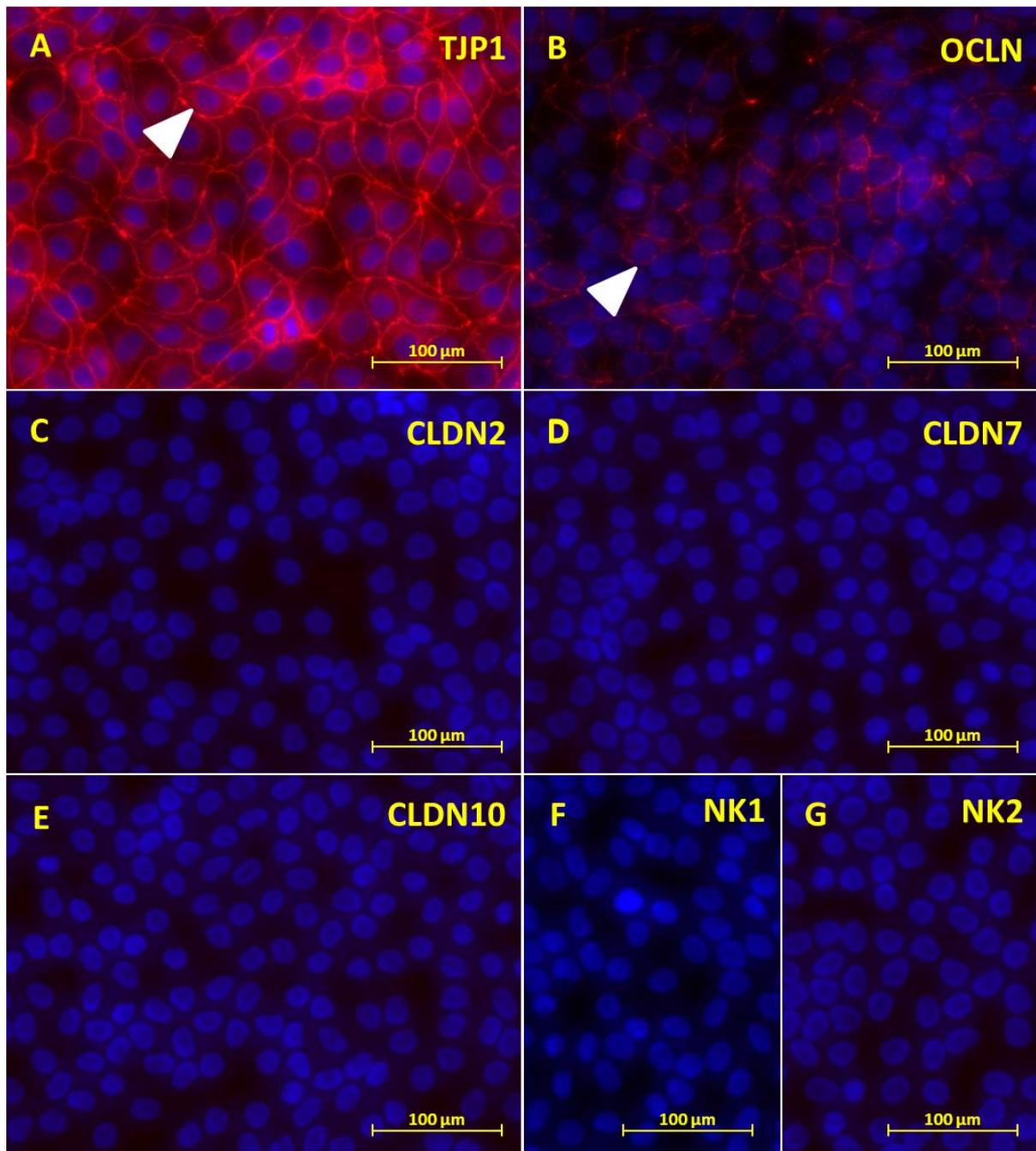
Protein	Zelllinien					Primärzellen	
	MDCKII	NRK-52E	IHKE-1	Caki-1	RPTEC	PRPTC	PMPTC
<b>TJP1</b>	+	+	+	(+)	+	+	+
<b>OCLN</b>	+	+	+	(+)	+	+	+
<b>CLDN2</b>	+	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)
<b>CLDN7</b>	+	-	-	-	+	+	+
<b>CLDN10</b>	-	-	-	-	(+)	-	-

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden wie folgt bewertet: +: deutliches Signal an den Zell-Zell-Kontakten, (+): Signal diffus oder überwiegend diffus, -: kein Signal



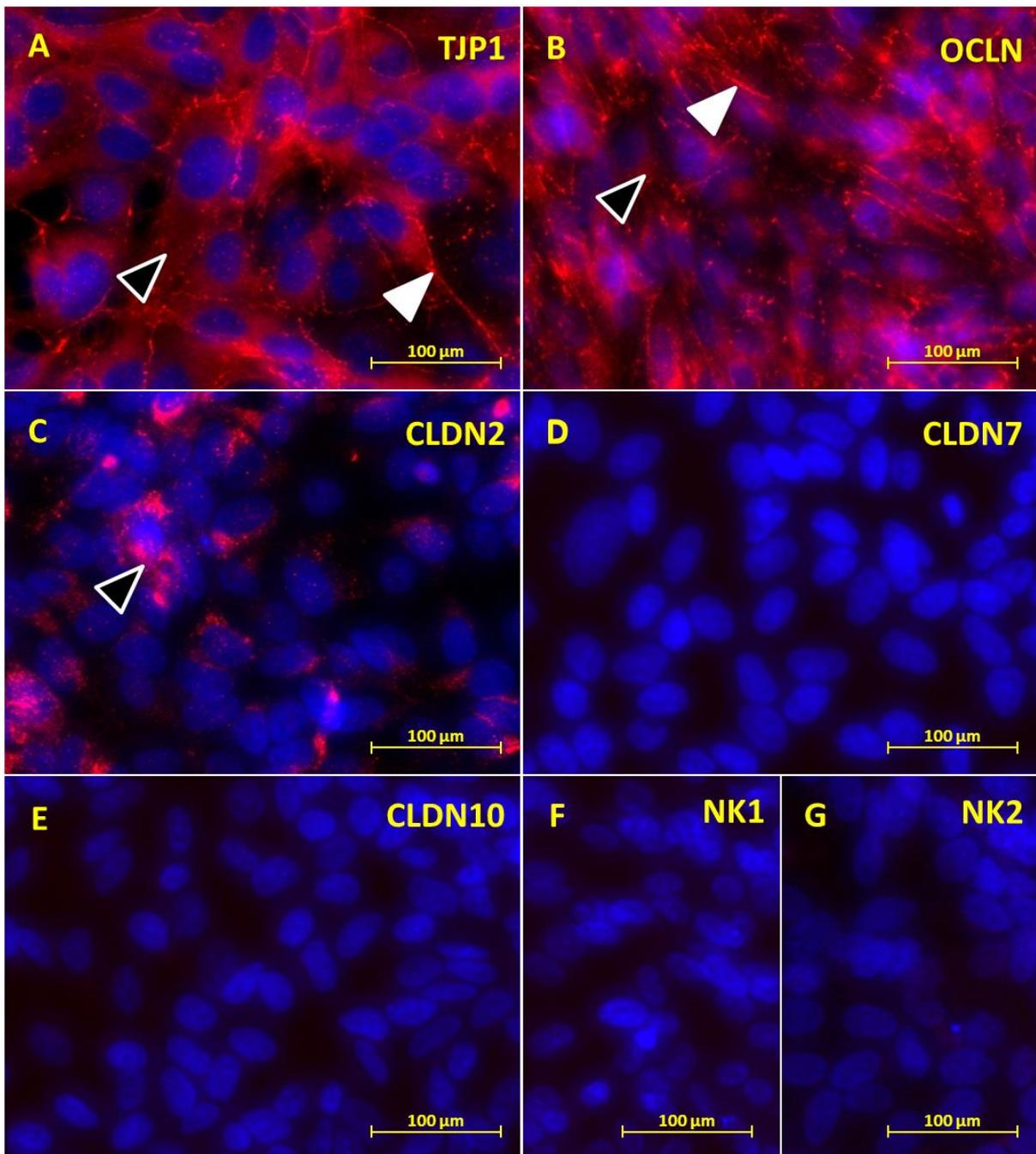
**Abbildung 2-9: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von MDCKII-Zellen.**

Dargestellt sind die Überlagerungen der Cy3-Fluoreszenz (rot eingefärbt) und der DAPI-Fluoreszenz (blau eingefärbt). Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. A: TJP1 (Kaninchen-anti-TJP1 (Z-R1) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), B: Occludin (Kaninchen-anti-Occludin (Z-T22) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), C: Claudin-2 (Maus-anti-Claudin-2 (12H12) (1:100)/anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), D: Claudin-7 (Kaninchen-anti-Claudin-7 (ZMD.241) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), E: Claudin-10 (Maus-anti-Claudin-10 (4B8A12) (1:100)/ anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), F: Negativkontrolle A, B, D (anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), G: Negativkontrolle C, E (anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)). Deutliche Cy3-Signale an den Zell-Zell-Kontakten sind exemplarisch mit weißen Dreiecken, diffuse Signale im Cytosol mit schwarzen Dreiecken markiert. Alle Aufnahmen wurden mit einer 200×-Vergrößerung erstellt. NK: Negativkontrolle



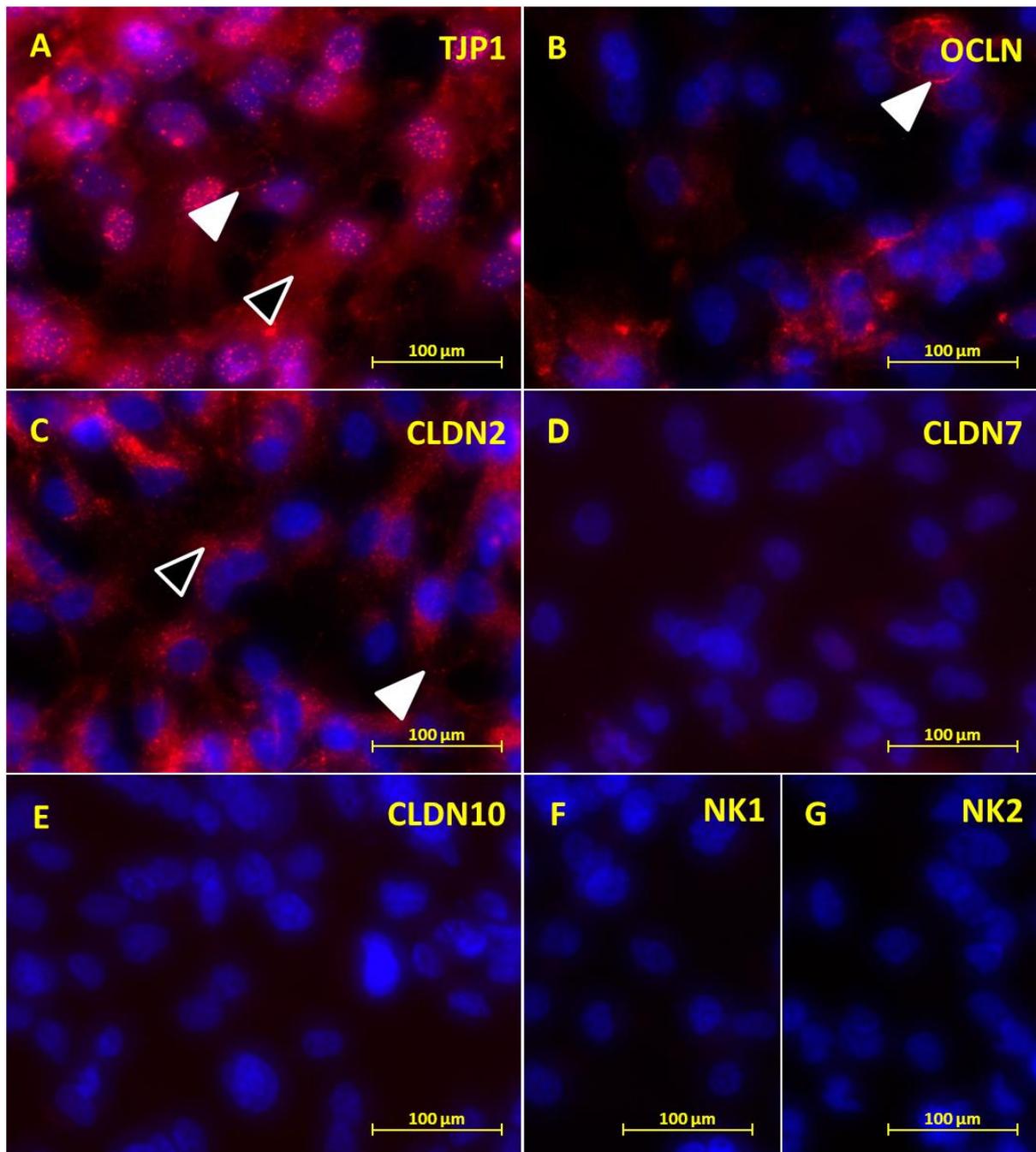
**Abbildung 2-10: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von NRK-52E-Zellen.**

Dargestellt sind die Überlagerungen der Cy3-Fluoreszenz (rot eingefärbt) und der DAPI-Fluoreszenz (blau eingefärbt). Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. A: TJP1 (Kaninchen-anti-TJP1 (Z-R1) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), B: Occludin (Kaninchen-anti-Occludin (Z-T22) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), C: Claudin-2 (Maus-anti- Claudin-2 (12H12) (1:100)/anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), D: Claudin-7 (Kaninchen-anti- Claudin-7 (ZMD.241) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), E: Claudin-10 (Maus-anti- Claudin-10 (4B8A12) (1:100)/ anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), F: Negativkontrolle A, B, D (anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), G: Negativkontrolle C, E (anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)). Deutliche Cy3-Signale an den Zell-Zell-Kontakten sind exemplarisch mit weißen Dreiecken, diffuse Signale im Cytosol mit schwarzen Dreiecken markiert. Alle Aufnahmen wurden mit einer 200×-Vergrößerung erstellt. NK: Negativkontrolle



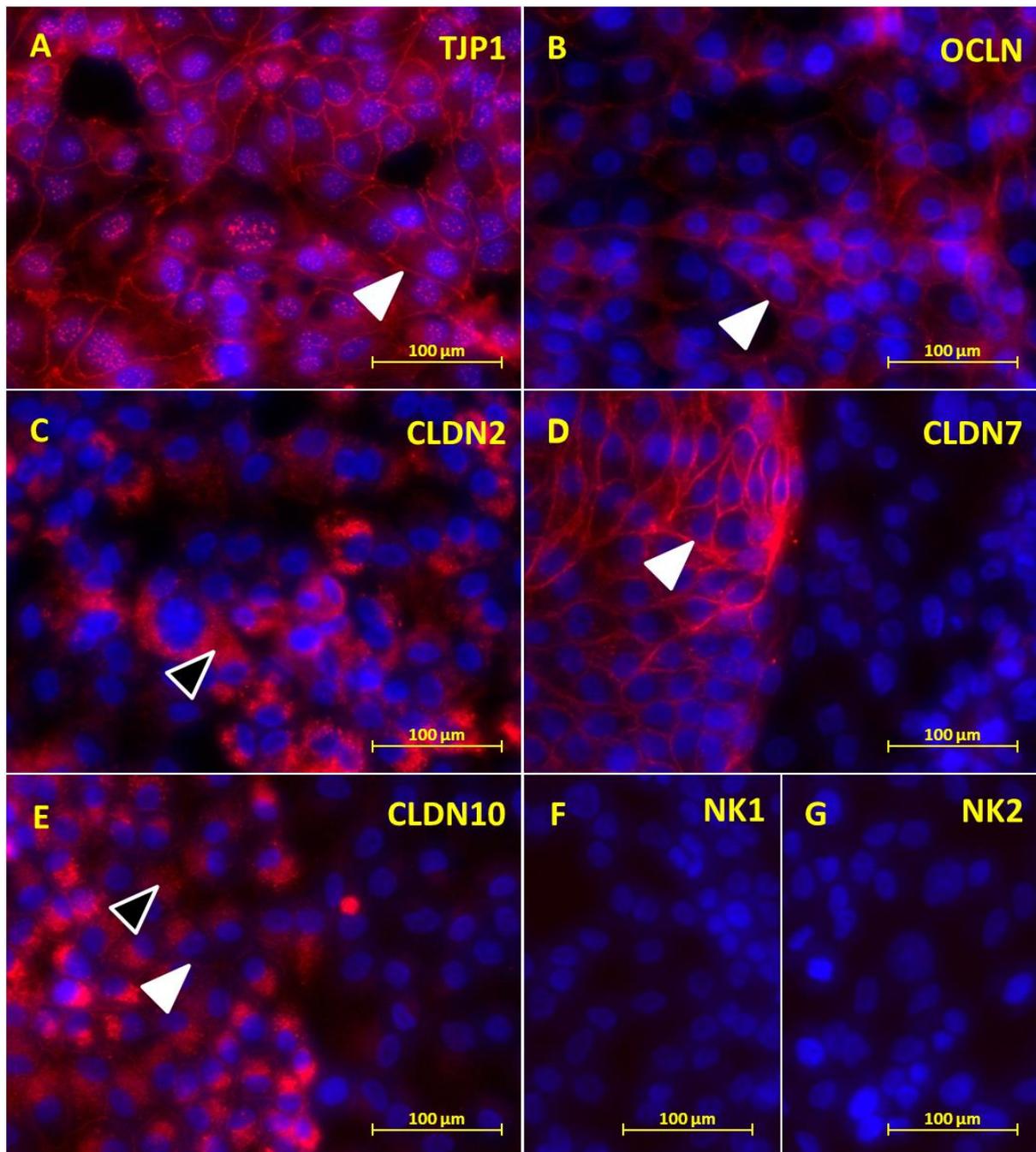
**Abbildung 2-11: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von IHKE-1-Zellen.**

Dargestellt sind die Überlagerungen der Cy3-Fluoreszenz (rot eingefärbt) und der DAPI-Fluoreszenz (blau eingefärbt). Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. A: TJP1 (Kaninchen-anti-TJP1 (Z-R1) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), B: Occludin (Kaninchen-anti-Occludin (Z-T22) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), C: Claudin-2 (Maus-anti- Claudin-2 (12H12) (1:100)/anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), D: Claudin-7 (Kaninchen-anti- Claudin-7 (ZMD.241) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), E: Claudin-10 (Maus-anti- Claudin-10 (4B8A12) (1:100)/ anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), F: Negativkontrolle A, B, D (anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), G: Negativkontrolle C, E (anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)). Deutliche Cy3-Signale an den Zell-Zell-Kontakten sind exemplarisch mit weißen Dreiecken, diffuse Signale im Cytosol mit schwarzen Dreiecken markiert. Alle Aufnahmen wurden mit einer 200×-Vergrößerung erstellt. NK: Negativkontrolle



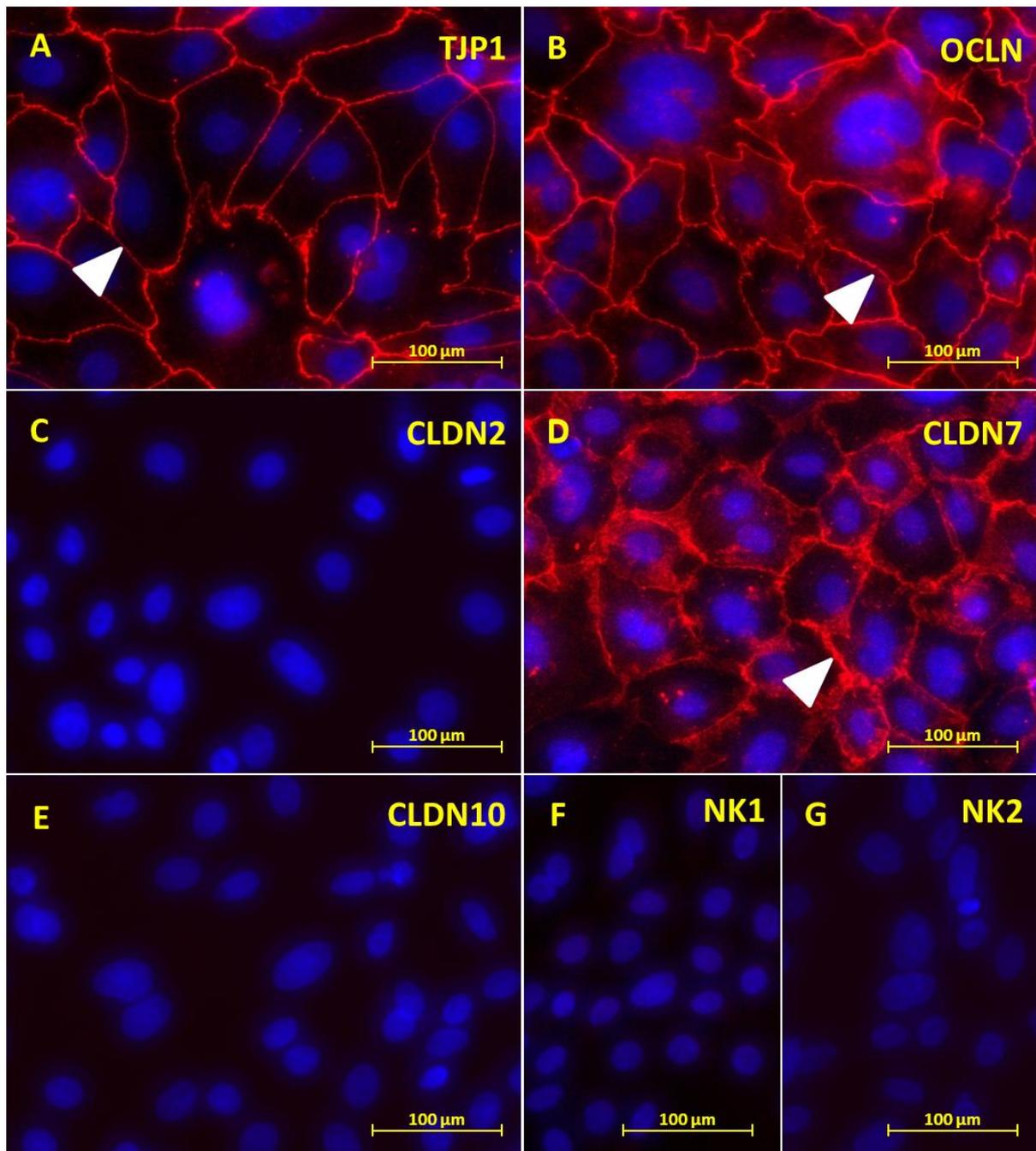
**Abbildung 2-12: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Caki-1-Zellen.**

Dargestellt sind die Überlagerungen der Cy3-Fluoreszenz (rot eingefärbt) und der DAPI-Fluoreszenz (blau eingefärbt). Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. A: TJP1 (Kaninchen-anti-TJP1 (Z-R1) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), B: Occludin (Kaninchen-anti-Occludin (Z-T22) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), C: Claudin-2 (Maus-anti- Claudin-2 (12H12) (1:100)/anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), D: Claudin-7 (Kaninchen-anti- Claudin-7 (ZMD.241) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), E: Claudin-10 (Maus-anti- Claudin-10 (4B8A12) (1:100)/ anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), F: Negativkontrolle A, B, D (anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), G: Negativkontrolle C, E (anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)). Deutliche Cy3-Signale an den Zell-Zell-Kontakten sind exemplarisch mit weißen Dreiecken, diffuse Signale im Cytosol mit schwarzen Dreiecken markiert. Alle Aufnahmen wurden mit einer 200×-Vergrößerung erstellt. NK: Negativkontrolle



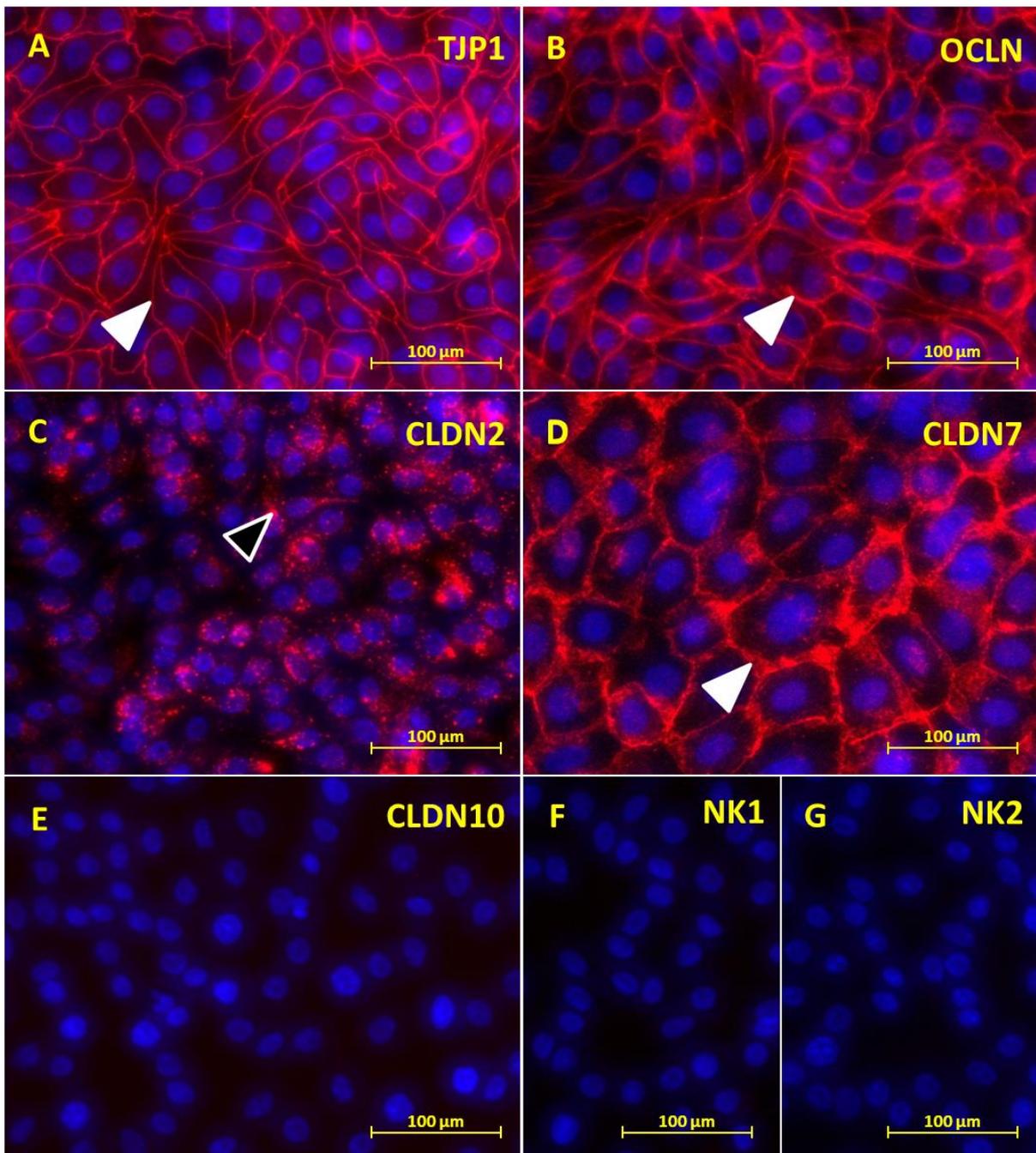
**Abbildung 2-13: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von RPTECs.**

Dargestellt sind die Überlagerungen der Cy3-Fluoreszenz (rot eingefärbt) und der DAPI-Fluoreszenz (blau eingefärbt). Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. A: TJP1 (Kaninchen-anti-TJP1 (Z-R1) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), B: Occludin (Kaninchen-anti-Occludin (Z-T22) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), C: Claudin-2 (Maus-anti- Claudin-2 (12H12) (1:100)/anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), D: Claudin-7 (Kaninchen-anti- Claudin-7 (ZMD.241) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), E: Claudin-10 (Maus-anti- Claudin-10 (4B8A12) (1:100)/ anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), F: Negativkontrolle A, B, D (anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), G: Negativkontrolle C, E (anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)). Deutliche Cy3-Signale an den Zell-Zell-Kontakten sind exemplarisch mit weißen Dreiecken, diffuse Signale im Cytosol mit schwarzen Dreiecken markiert. Alle Aufnahmen wurden mit einer 200×-Vergrößerung erstellt. NK: Negativkontrolle



**Abbildung 2-14: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von PRPTCs.**

Dargestellt sind die Überlagerungen der Cy3-Fluoreszenz (rot eingefärbt) und der DAPI-Fluoreszenz (blau eingefärbt). Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. A: TJP1 (Kaninchen-anti-TJP1 (Z-R1) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), B: Occludin (Kaninchen-anti-Occludin (Z-T22) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), C: Claudin-2 (Maus-anti- Claudin-2 (12H12) (1:100)/anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), D: Claudin-7 (Kaninchen-anti- Claudin-7 (ZMD.241) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), E: Claudin-10 (Maus-anti- Claudin-10 (4B8A12) (1:100)/ anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), F: Negativkontrolle A, B, D (anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), G: Negativkontrolle C, E (anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)). Deutliche Cy3-Signale an den Zell-Zell-Kontakten sind exemplarisch mit weißen Dreiecken, diffuse Signale im Cytosol mit schwarzen Dreiecken markiert. Alle Aufnahmen wurden mit einer 200×-Vergrößerung erstellt. NK: Negativkontrolle



**Abbildung 2-15: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von PMPTCs.**

Dargestellt sind die Überlagerungen der Cy3-Fluoreszenz (rot eingefärbt) und der DAPI-Fluoreszenz (blau eingefärbt). Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. A: TJP1 (Kaninchen-anti-TJP1 (Z-R1) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), B: Occludin (Kaninchen-anti-Occludin (Z-T22) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), C: Claudin-2 (Maus-anti- Claudin-2 (12H12) (1:100)/anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), D: Claudin-7 (Kaninchen-anti- Claudin-7 (ZMD.241) (1:400)/anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), E: Claudin-10 (Maus-anti- Claudin-10 (4B8A12) (1:100)/ anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)), F: Negativkontrolle A, B, D (anti-Kaninchen-IgG-Cy3 (1:100)), G: Negativkontrolle C, E (anti-Maus-IgG-Cy3 (1:100)). Deutliche Cy3-Signale an den Zell-Zell-Kontakten sind exemplarisch mit weißen Dreiecken, diffuse Signale im Cytosol mit schwarzen Dreiecken markiert. Alle Aufnahmen wurden mit einer 200×-Vergrößerung erstellt. NK: Negativkontrolle

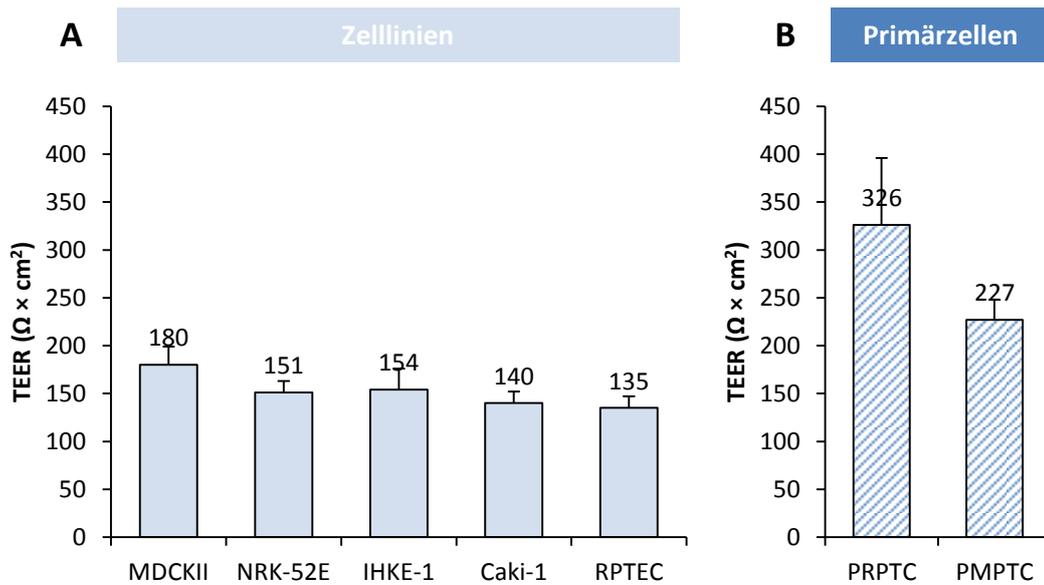
### 2.3.2 Funktionelle Charakterisierung: Dichtigkeit der Zell-Monolayer

Um die Expressionsdaten zu den *Tight-Junction*-Proteinen in einen funktionellen Kontext zu stellen, wurde nun im nächsten Schritt überprüft, inwieweit sich die beobachteten Expressionsunterschiede mit den Barriereeigenschaften der Zellen korrelieren ließen. Zu diesem Zweck wurden zum einem Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) durchgeführt und zum anderem in bidirektionalen Transportversuchen mit Mannitol die Durchlässigkeit der Zell-Monolayer untersucht.

#### 2.3.2.1 Untersuchung des Transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) misst den Ionenfluss über einen Zell-Monolayer und wird daher häufig als ein Maß für dessen Dichtigkeit herangezogen (Gaillard and de Boer, 2000; Lehr, 2003). Die zu untersuchenden Nierenzelllinien MDCKII, NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1 sowie primäre Nierenzellen aus der Ratte und dem Affen wurden daher zur Bestimmung der TEER-Werte der Monolayer auf permeablen Membranfiltereinsätzen ausgesät und nach 5 Tagen Kulturdauer der elektrische Widerstand wie in Kapitel 1.9.1 beschrieben gemessen.

Die Ergebnisse der TEER-Messungen sind in Abbildung 2-16 dargestellt. Daraus geht hervor, dass die PRPTCs den höchsten TEER-Wert erreichten, der mit  $326 \pm 70 \Omega \times \text{cm}^2$  etwa 1,8-mal höher als in MDCKII-Zellen war. Ein etwas geringerer TEER-Wert von  $227 \pm 21 \Omega \times \text{cm}^2$  konnte bei den PMPTCs beobachtet werden. Von den untersuchten Zelllinien erreichten die MDCKII-Zellen mit  $180 \pm 19 \Omega \times \text{cm}^2$  den höchsten Wert. Die TEER-Werte der weiteren Zelllinien lagen knapp darunter und betragen  $151 \pm 12 \Omega \times \text{cm}^2$  für NRK-52E-Zellen,  $154 \pm 22 \Omega \times \text{cm}^2$  für IHKE-1-Zellen sowie  $140 \pm 12 \Omega \times \text{cm}^2$  für Caki-1-Zellen. Der niedrigste TEER-Wert wurde mit  $135 \pm 12 \Omega \times \text{cm}^2$  für RPTECs festgestellt.



**Abbildung 2-16: Transepitheliale elektrische Widerstände (TEER) der Nierenzelllinien und primären Nierenzellen.**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 1-4 unabhängigen Versuchen.

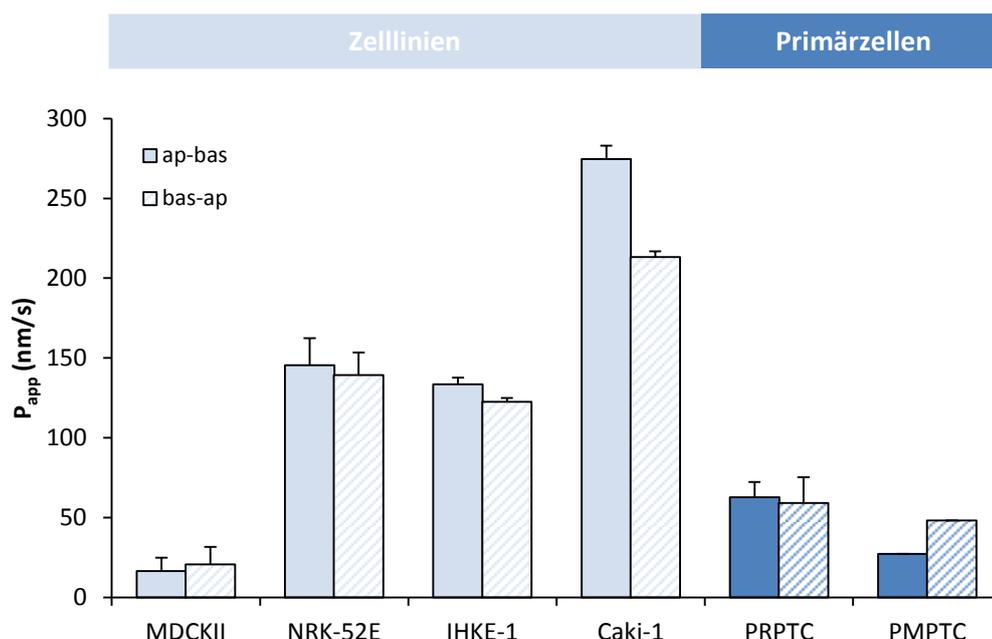
### 2.3.2.2 Permeationseigenschaften der Monolayer: Bidirektionale Transportversuche mit Mannitol

Durch Transportversuche mit auf permeablen Membranfiltereinsätzen kultivierten Zellen kann der gerichtete Transport von Substanzen über den Zell-Monolayer untersucht werden. Die Aufteilung in ein Donor- und ein Akzeptorkompartiment erlaubt dabei eine Unterscheidung zwischen dem Transport von der apikalen zur basolateralen Seite (ap-bas) beziehungsweise umgekehrt von der basolateralen zur apikalen Seite (bas-ap). Wählt man für die Versuche eine Testsubstanz für die bekannt ist, dass sie ausschließlich auf parazellulärem Weg permeiert, lässt sich die Dichtigkeit der untersuchten Monolayer abschätzen. Eine gut charakterisierte Marker-Substanz für den parazellulären Transport ist Mannitol (Ghandehari *et al.*, 1997; Van Itallie *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2003). Um eine Aussage über die Dichtigkeit der verschiedenen Zellmodelle treffen zu können, wurde daher der bidirektionale Mannitol-Transport über die Monolayer untersucht. Dazu wurden die Zellen, wie bereits zur Messung der TEER-Werte, auf permeablen Membranfiltereinsätzen ausgesät und 5 Tage unter Standardkulturbedingungen kultiviert. Im Anschluss wurden, wie in Kapitel 2.5.2.1 beschrieben, die Transportversuche mit [ $^{14}\text{C}$ ]-markiertem Mannitol durchgeführt und die apparenten Permeationskoeffizienten bestimmt.

Den in Abbildung 2-17 gezeigten Resultaten ist zu entnehmen, dass sich die Monolayer der untersuchten Zellen deutlich in Bezug auf die Permeationseigenschaften von Mannitol unterscheiden. So wies Mannitol über die MDCKII-Monolayer die geringste Permeationsgeschwindigkeit auf. Sowohl in apikal-basolaterale Richtung ( $P_{\text{app}}(\text{ap-bas}) = 16,5 \pm 8,3 \text{ nm/s}$ ) als auch in basolateral-apikale Richtung

( $P_{app}(\text{bas-ap}) = 20,7 \pm 10,9 \text{ nm/s}$ ) war nur ein geringer Substanzfluss zu beobachten. Im Gegensatz zu den MDCK-Zellen konnte bei den NRK-52E- und IHKE-1-Zellen eine hohe Permeationsgeschwindigkeit für Mannitol gemessen werden. Die entsprechenden  $P_{app}$ -Werte waren bei beiden Zelllinien etwa gleich hoch und betragen für die apikal-basolaterale Richtung  $145,4 \pm 17,1 \text{ nm/s}$  für NRK-52E- und  $133,5 \pm 4,2 \text{ nm/s}$  für IHKE-1-Zellen beziehungsweise für die basolateral-apikale Richtung  $139,3 \pm 14,1 \text{ nm/s}$  und  $122,5 \pm 2,5 \text{ nm/s}$ . Eine noch höhere Permeation von Mannitol wurde erwartungsgemäß bei den Caki-1-Zellen gefunden, da diese als einzige der hier untersuchten Zellen keinen konfluenten *Monolayer* ausbildeten (siehe Kapitel 2.2.1). Die ebenfalls nicht konfluent gewachsenen RPTECs standen für die bidirektionalen Transportversuche leider nicht zur Verfügung. Die Permeationsgeschwindigkeit von Mannitol über die Caki-1-*Monolayer* betrug für die apikal-basolaterale Richtung  $274,6 \pm 8,4 \text{ nm/s}$  und für die basolateral-apikale Richtung  $213,3 \pm 3,4 \text{ nm/s}$ . Der dadurch erhaltene *Efflux Ratio* von 0,78 stellt vermutlich ein Messartefakt dar, da mit in Kontroll-Filtereinsätzen ohne Zellen ähnliche Permeationsgeschwindigkeiten und ein *Efflux Ratio* von 0,78 gemessen wurden (nicht dargestellt).

Für die kultivierten primären Nierenzellen wurde in beide Transportrichtungen eine moderate Mannitol-Permeation ermittelt ( $P_{app}(\text{ap-bas}) = 62,7 \pm 9,5 \text{ nm/s}$  und  $P_{app}(\text{bas-ap}) = 59,2 \pm 16,2 \text{ nm/s}$ ), welche etwas oberhalb der Werte der MDCKII-Zellen lag. Die Permeationsgeschwindigkeiten über die PMPTC-*Monolayer* bewegten sich in einer ähnlichen Größenordnung wie bei den PRPTCs. Erwartungsgemäß konnte im Anschluss an die Versuche in keinem Fall eine nennenswerte Menge an Substanz (> 0,4 %) in den Zellen wiedergefunden werden (siehe Tabelle 2-5), da Mannitol nicht membrangängig ist und nicht aktiv von den Zellen aufgenommen wird. Entsprechende Versuche mit ebenfalls als Marker-Substanz für den parazellulären Transport verwendeten [ $^{14}\text{C}$ ]-Sucrose (2  $\mu\text{M}$ ) zeigten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 2-17: Apparente Permeationskoeffizienten ( $P_{app}$ ) von [ $^{14}\text{C}$ ]-Mannitol über die Monolayer der Nierenzelllinien und primären Nierenzellen.**

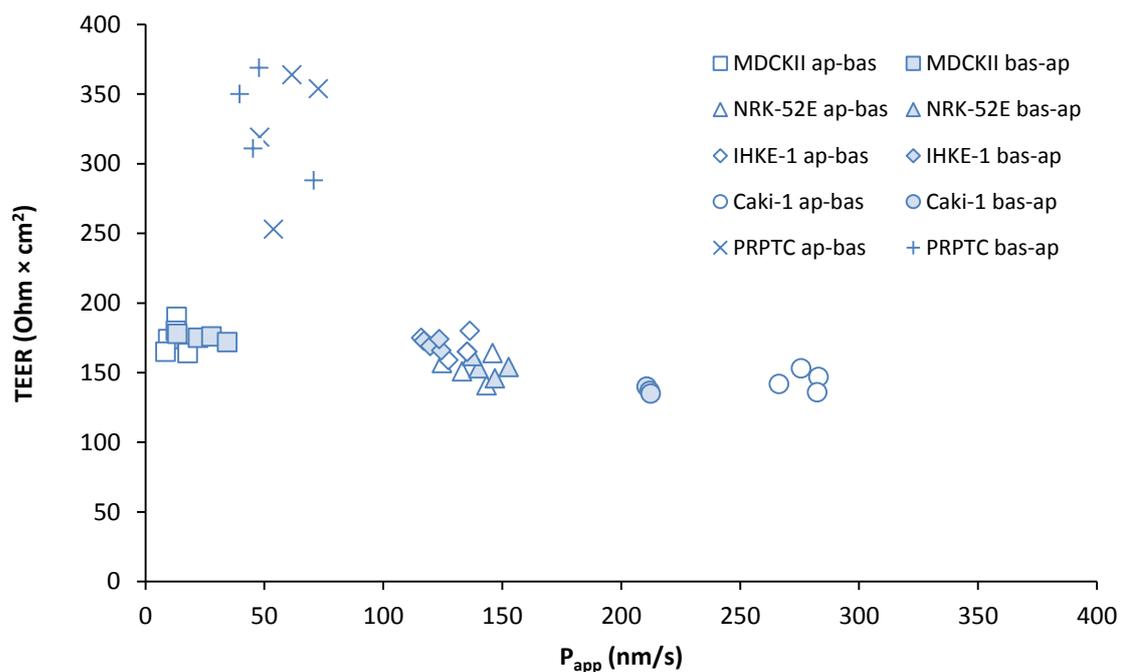
Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. Eingesetzt wurde 6  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Mannitol (12,5 KBq/ml). Die Inkubationszeit betrug 120 min. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 2-6 unabhängigen Versuchen, für PMPTCs wurde nur ein Einfachversuch durchgeführt.

**Tabelle 2-5: Ergebnisse der bidirektionalen Transportversuche mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Mannitol in den Nierenzelllinien und primären Nierenzellen.**

	Zelllinien				Primärzellen	
	MDCKII	NRK-52E	IHKE-1	Caki-1	PRPTC	PMPTC*
<b>ap-bas</b>						
$P_{app}$ (nm/s)	16,5 $\pm$ 8,3	145,4 $\pm$ 17,1	133,5 $\pm$ 4,2	274,6 $\pm$ 8,4	62,7 $\pm$ 9,5	27,2
$WF_{Akz}$ (%)	2,6 $\pm$ 1,3	22,5 $\pm$ 2,6	20,9 $\pm$ 0,5	41,3 $\pm$ 1,7	9,8 $\pm$ 1,6	4,3
$WF_z$ (%)	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	0,1
$WF_{ges}$ (%)	98,3 $\pm$ 1,2	97,5 $\pm$ 1,4	97,4 $\pm$ 2,2	95,9 $\pm$ 2,8	97,3 $\pm$ 3,5	99,1
<b>bas-ap</b>						
$P_{app}$ (nm/s)	20,7 $\pm$ 10,9	139,3 $\pm$ 14,1	122,5 $\pm$ 2,5	213,3 $\pm$ 3,4	59,2 $\pm$ 16,2	48,2
$WF_{Akz}$ (%)	1,1 $\pm$ 0,6	7,1 $\pm$ 0,5	6,2 $\pm$ 0,2	10,7 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,7	2,5
$WF_z$ (%)	0,1 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,3	0,2
$WF_{ges}$ (%)	97,6 $\pm$ 3,0	96,2 $\pm$ 3,1	95,7 $\pm$ 1,2	94,8 $\pm$ 3,4	96,6 $\pm$ 4,3	98,6
<b>Efflux Ratio</b>	<b>1,26</b>	<b>0,96</b>	<b>0,92</b>	<b>0,78</b>	<b>0,94</b>	<b>1,77</b>

$P_{app}$ : Apparenter Permeationskoeffizient,  $WF_{Akz}$ : Wiederfindung im Akzeptorkompartiment,  $WF_z$ : Wiederfindung in den lytierten Zellen,  $WF_{ges}$ : Wiederfindung gesamt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 2-6 unabhängigen Versuchen, \*für PMPTCs wurde nur ein Einfachversuch durchgeführt.

Um zu überprüfen, inwieweit der gemessene elektrische Widerstand mit den Permeationsgeschwindigkeiten von Mannitol korreliert, wurden die TEER-Werte gegen die für die Mannitol-Permeation ermittelten  $P_{app}$ -Werte geplottet (siehe Abbildung 2-18). Aus der Graphik lässt sich keine enge Korrelation zwischen TEER-Werten und Mannitol-Permeationsgeschwindigkeiten erkennen. Obwohl mit den Nierenzelllinien NRK-52E, IHKE 1 und Caki-1 deutlich unterschiedliche Mannitol-Permeationsgeschwindigkeiten gemessen wurden, waren die TEER Werte nur geringfügig unterschiedlich (im Bereich 130–180  $\Omega \times \text{cm}^2$ ). Nur bei den PRPTCs korrelierten die sehr hohen TEER-Werte ( $326 \pm 70 \Omega \times \text{cm}^2$ ), das heißt eine hohe Dichtigkeit, mit niedrigen Permeationsgeschwindigkeiten von Mannitol. Obwohl bei MDCKII-Zellen eine noch niedrigere Mannitol-Permeation als bei PRPTCs beobachtet wurde, waren die TEER-Werte deutlich niedriger als bei den PRPTCs. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der elektrische Widerstand eines *Zell-Monolayers* nicht zwingend Auskunft über die Dichtigkeit der Zellen gibt. Um um über die Dichtigkeit der Zellsysteme urteilen zu können müssen noch weitere Parameter herangezogen werden.



**Abbildung 2-18: Apparente Permeationskoeffizienten ( $P_{app}$ ) von [ $^{14}\text{C}$ ]-Mannitol über die Monolayer der Nierenzelllinien und primären Nierenzellen in Korrelation zu den entsprechenden transepithelialen elektrischen Widerständen (TEER).**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. Eingesetzt wurde 6  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Mannitol (12,5 KBq/ml). Die Inkubationszeit betrug 120 min. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Versuchen.

## 2.4 TRANSPORTEIGENSCHAFTEN DER UNTERSUCHTEN ZELLMODELLE

Zusätzlich zur molekularbiologischen Charakterisierung der verschiedenen renalen Zellmodelle hinsichtlich der Expression typischer tubulärer Marker-Gene sowie der Charakterisierung der *Tight Junctions*, wurden nachfolgend die Transporteigenschaften der Zellen evaluiert.

Eine wesentliche Aufgabe der Nieren im Allgemeinen beziehungsweise der proximalen Tubuli im Speziellen ist die Sekretion und Reabsorption einer Reihe physiologischer Substanzen und Xenobiotika. Neben rein passiven, konzentrationsgetriebenen Prozessen sind daran vor allem aktive Transportprozesse beteiligt. In einem zweistufigen transepithelialen Transportprozess nehmen Aufnahmetransporter dabei die Substanzen an der basolateralen Seite in die proximalen Tubuluszellen auf und Efflux-Transporter geben diese auf der apikalen Seite wieder in das Tubuluslumen ab. Entscheidend dafür, ob eine Substanz aktiv von den Zellen aufgenommen und/oder sezerniert wird, und somit mitentscheidend über das renale Schicksal einer Substanz, sind daher die in den proximalen Tubuluszellen exprimierten Aufnahme- und Efflux-Transporter. In der Pharmakokinetik ist das Wissen über die in den proximalen Tubuluszellen vorhandenen klinisch relevanten Transporter aus diesem Grund von zentraler Bedeutung und spielt insbesondere bei der Beurteilung von Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen eine große Rolle. Zur Vorhersage der kinetischen Eigenschaften eines Wirkstoffs in der Niere wäre ein Zellmodell wünschenswert, das sowohl die *In-vivo*-Expressionsprofile als auch die Transportaktivität klinisch relevanter Transporter möglichst gut widerspiegelt. Um zu untersuchen, ob dies für die zu untersuchenden Zellmodelle der Fall ist, wurde zunächst die mRNA-Expression wichtiger Wirkstoff-Transporter in den verfügbaren Nierenzelllinien und in aus Ratten- und Affeniere gewonnenen primären Nierenzellen evaluiert. Inwieweit sich die Transporter-mRNA-Expression auch in Transporter-Aktivität widerspiegelt, wurde durch nachfolgende Transportstudien überprüft

### 2.4.1 Biochemische Charakterisierung: Expressionsanalyse von Transport-Proteinen

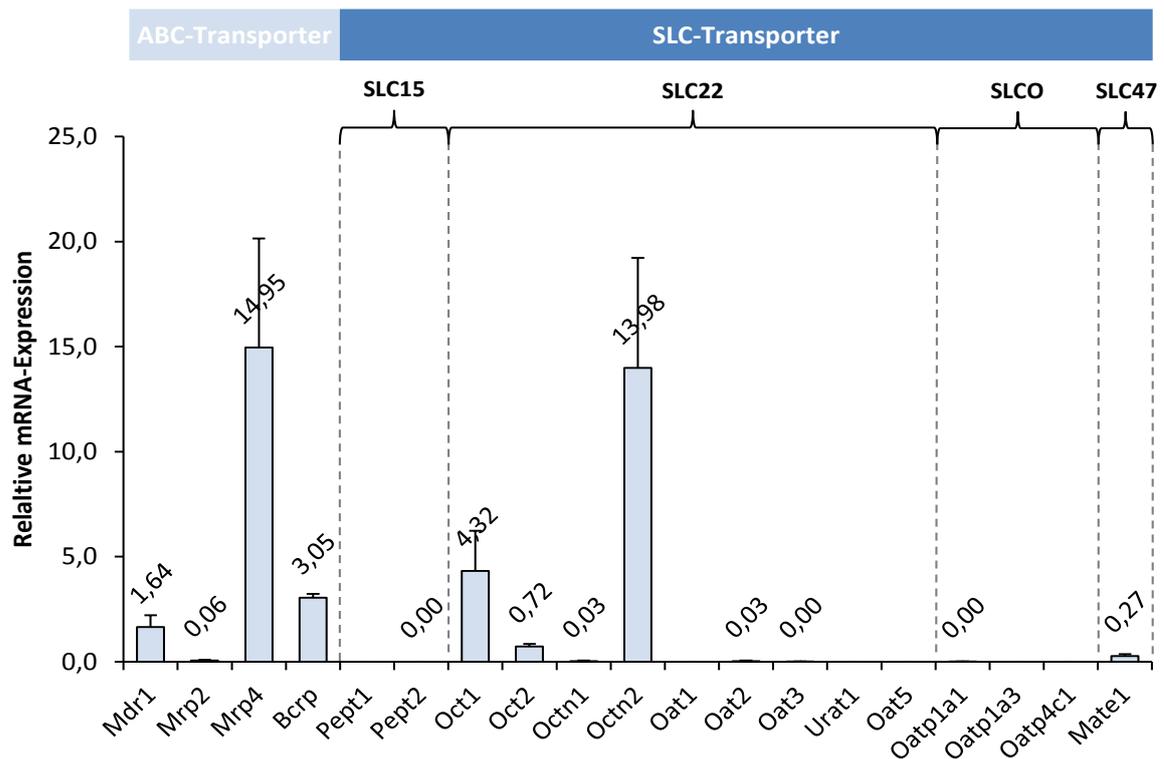
Für eine Reihe von Transportproteinen aus der Superfamilie der ABC-Transporter sowie der SLC-Transporter hat sich in den letzten Jahren eine wesentliche Beteiligung an der Pharmakokinetik, Wirksamkeit und Nebenwirkungsprofil vieler Arzneistoffe herausgestellt (Giacomini *et al.*, 2010). Von einer Vielzahl dieser Arzneistoff-Transporter ist bekannt, dass sie in den proximalen Tubuli der Niere des Menschen und/oder der Ratte vorkommen. Dazu gehören neben den ABC-Transportern MDR1/Mdr1 (*Abcb1/ABCB1*), MRP2/Mrp2 (*Abcc2/ABCC2*), MRP4/Mrp4 (*Abcc4/ABCC4*) und BCRP/Bcrp (*Abcg2/ABCG2*) vor allem verschiedene Vertreter der Aufnahmetransporter aus der SLC22- und der SLCO-Familie. Außerdem von Bedeutung sind auch MATE1/Mate1 und MATE2-K (*Slc47a1/SLC47A1* und *SLC47A2*) sowie PEPT1/Pept1 (*Slc15a1/SLC15A2*) und PEPT2/Pept2 (*Slc15a2/SLC15A2*).

Da die genannten Transporter eine entscheidende Rolle bei den Aufnahme- und Sekretionsprozessen von Arzneistoffen in den proximalen Tubuli spielen, wurde deren Expression in den primären Nierenzellen und Nierenzelllinien evaluiert. Aufgrund der Spezies-spezifischen Expression einiger Transporter wurden nicht alle Transporter in allen Zellen untersucht. So ist das Vorkommen von MATE2-K (*SLC47A2*) und OAT4 (*SLC22A9*) in den proximalen Tubuli auf den Menschen beschränkt und wurde daher nur in den Zelllinien IHKE-1 und Caki-1 betrachtet. Die Expressionsstärken für Oat5 (*Slc22a24*), Oatp1a1 (*Slco1a1*) und Oatp1a3 (*Slco1a3*) wurden aufgrund der Beschränkung des Vorkommens dieser Transporter auf die Ratte hingegen nur in der NRK-52E-Zelllinie sowie in den primären Nierenzellen aus der Ratte bestimmt.

Die Evaluierung der Transporter-Expression auf mRNA-Ebene erfolgte wie in den Kapiteln 2.2.2.1 und 2.3.1.1 beschrieben. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 2-19 bis Abbildung 2-24 sowie in Tabelle 2-6 dargestellt. Wie aus den Abbildungen hervorgeht, exprimieren die untersuchten Zellen die analysierten Transporter-Gene sehr unterschiedlich.

#### ***Expression der Transport-Proteine in den Nierenzelllinien***

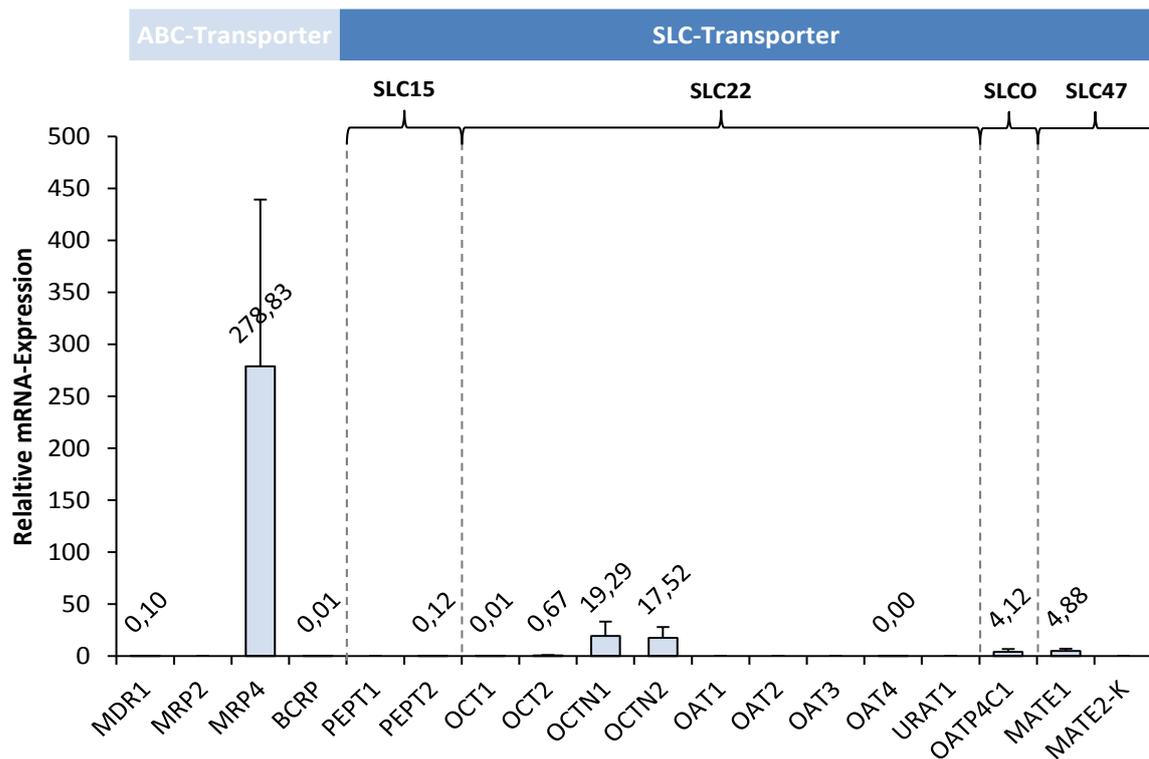
In der NRK-52E-Zelllinie war das Expressionsniveau aller untersuchten Transporter generell vergleichsweise gering (siehe Abbildung 2-19). Die höchste relative Expression wurde für Mrp4 und Octn2 gefunden. Ein Nachweis auf etwas geringerem Level erfolgte außerdem für die ABC-Transporter Mdr1 und Bcrp, für die organischen Kationen-Transporter Oct1 und Oct2 und für Mate1. Alle weiteren Transporter ließen sich nur in sehr geringer Menge nachweisen oder befanden sich unterhalb der Nachweisgrenze.



**Abbildung 2-19: Relative mRNA-Expressionsdaten der untersuchten Transporter in der NRK-52E-Zelllinie.**

Die mRNA-Expressionen wurden auf die *Gapdh*-Expression in der jeweiligen Probe normalisiert und ist als  $2^{-(\Delta C_T)} \times 10^3$  angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. Sofern kein Wert angegeben ist befand sich die Expression unterhalb der Nachweisgrenze.

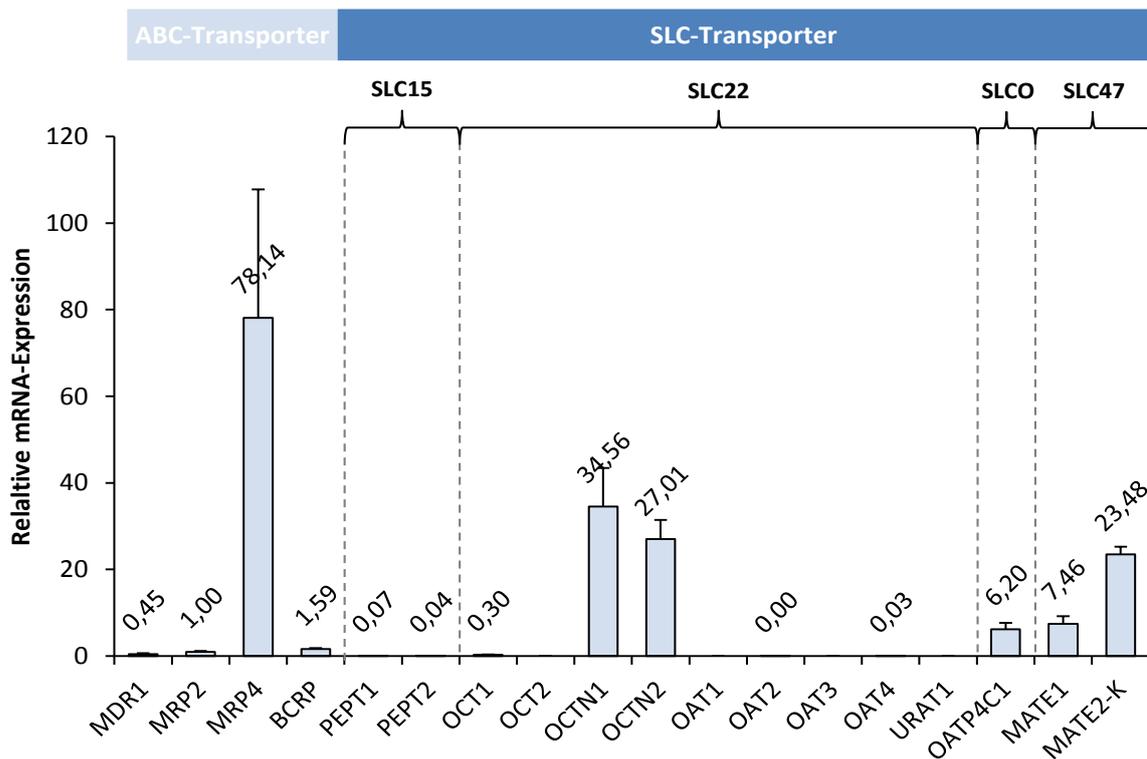
Während IHKE-1-Zellen eine hohe Expressionsstärke für MRP4 aufwiesen, konnten die anderen ABC-Transporter nur in minimalen Mengen detektiert werden, beziehungsweise befanden sich unterhalb der Nachweisgrenze (siehe Abbildung 2-20). Weiterhin wurden OCTN1, OCTN2 und MATE1 in moderaten Mengen, sowie OCT2 in geringerem Ausmaß exprimiert. Als einziger Vertreter der Anionen-Transporter konnte OATP4C1 gefunden werden. Darüber hinaus wurde auch PEPT2 nachgewiesen.



**Abbildung 2-20: Relative mRNA-Expressionsdaten der untersuchten Transporter in der IHKE-1-Zelllinie.**

Die mRNA-Expressionen wurden auf die *GAPDH*-Expression in der jeweiligen Probe normalisiert und ist als  $2^{-(\Delta C_T)} \times 10^3$  angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. Sofern kein Wert angegeben ist befand sich die Expression unterhalb der Nachweisgrenze.

Wie in den anderen beiden Nierenzelllinien (IHKE-1 und NRK-52E, siehe oben) konnte auch in der Caki-1-Zelllinie die höchste relative Expression für MRP4 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2-21). Im Unterschied zu den IHKE-1-Zellen konnte jedoch auch noch eine geringe Expression weiterer Vertreter der ABC-Transporter-Familie (MDR1, MRP2 und BCRP) gemessen werden. Es konnte ebenfalls, in unterschiedlichem Ausmaß, die Expression aller untersuchten Kationen-Transporter mit Ausnahme von OCT2 detektiert werden. Analog zu den IHKE-1-Zellen, wurde die stärkste Expression für OCTN1 und OCTN2 beobachtet. In etwas geringerem Maße konnte auch MATE1 detektiert werden. Allerdings zeigten die Caki-1-Zellen im Unterschied zu den IHKE-1-Zellen auch eine Expression von MATE2-K. Wie auch bereits in den NRK-52E- und IHKE-1-Zellen wurde als Anionen-Transporter lediglich OATP4C1 in moderaten Mengen identifiziert.



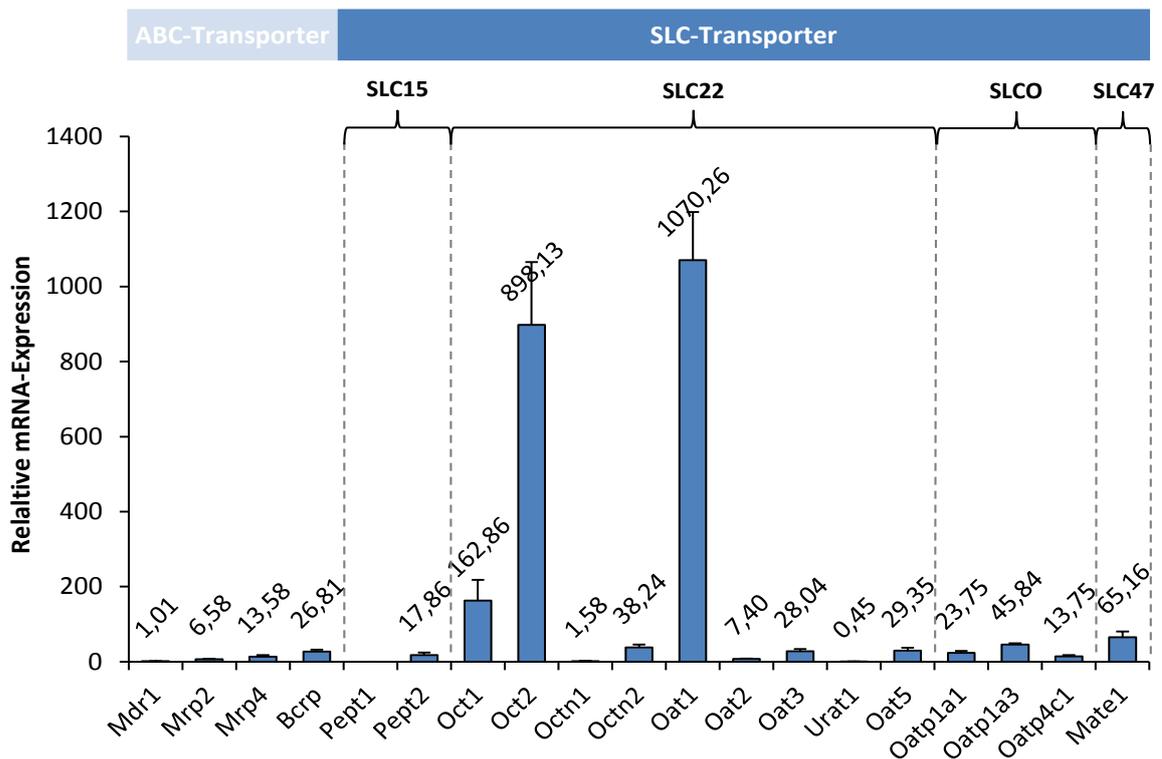
**Abbildung 2-21: Relative mRNA-Expressionsdaten der untersuchten Transporter in der Caki-1-Zelllinie.**

Die mRNA-Expressionen wurden auf die *GAPDH*-Expression in der jeweiligen Probe normalisiert und ist als  $2^{-(\Delta C_T)} \times 10^3$  angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. Sofern kein Wert angegeben ist befand sich die Expression unterhalb der Nachweisgrenze.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, lässt sich zunächst feststellen, dass in den untersuchten Nierenzelllinien nur ein Teil der untersuchten Transporter nachweisbar war. Das heißt, es wurde nicht das ganze Spektrum *der in vivo* exprimierten Transporter auf mRNA-Ebene exprimiert. Auffällig war vor allem das fast vollständige Fehlen der organischen Anionen-Transporter aus der SLC22- und der SLCO-Familie. Die einzige Ausnahme stellte hier OATP4C1 dar, welches in moderaten Mengen in den beiden humanen Zelllinien IHKE-1 und Caki-1 gefunden wurde. Auch für die Peptidtransporter PEPT1/Pept1 und PEPT2/Pept2 ließen sich in den Zelllinien nur sehr geringe mRNA-Mengen nachweisen.

#### **Expression der Transport-Proteine in frisch isolierten primären Nierenzellen**

Ein gänzlich anderes Bild als in den Zelllinien zeichnete sich bei den frisch isolierten primären Nierenzellen ab (siehe Abbildung 2-23). Mit Ausnahme von Pept1 konnten in den frischen Primärzellen alle untersuchten Transporter detektiert werden. Die höchste relative Expression wurde für Oat1 gemessen. Eine ebenfalls sehr hohe Expressionsstärke zeigte sich für Oct2. Damit wiesen die frisch isolierten primären Nierenzellen die höchsten relativen Expressionen für die beiden typischen renalen Vertreter der OAT- beziehungsweise OCT-Familie (Oat1 und Oct2) auf. Mit Oat2, Oat3, Oat5, Oatp1a1 und Oatp1a3 wurden darüber hinaus neben Oat1 noch eine Reihe weiterer Anionen-Transporter gefunden, deren Expression in den Zelllinien nur minimal oder nicht nachweisbar war.

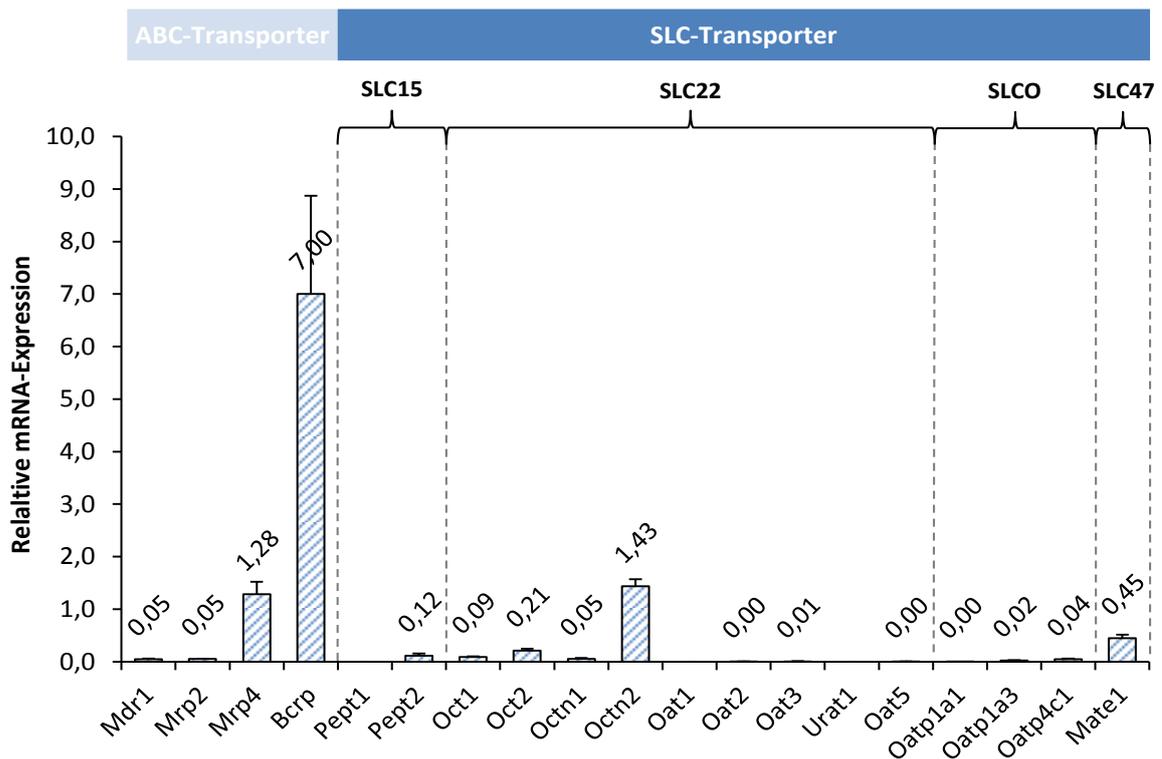


**Abbildung 2-22: Relative mRNA-Expressionsdaten der untersuchten Transporter in frisch isolierten PRPTCs.**

Die mRNA-Expressionen wurden auf die *Gapdh*-Expression in der jeweiligen Probe normalisiert und ist als  $2^{-(\Delta C_T)} \times 10^3$  angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. Sofern kein Wert angegeben ist befand sich die Expression unterhalb der Nachweisgrenze.

### **Expression der Transport-Proteine in kultivierten primären Nierenzellen**

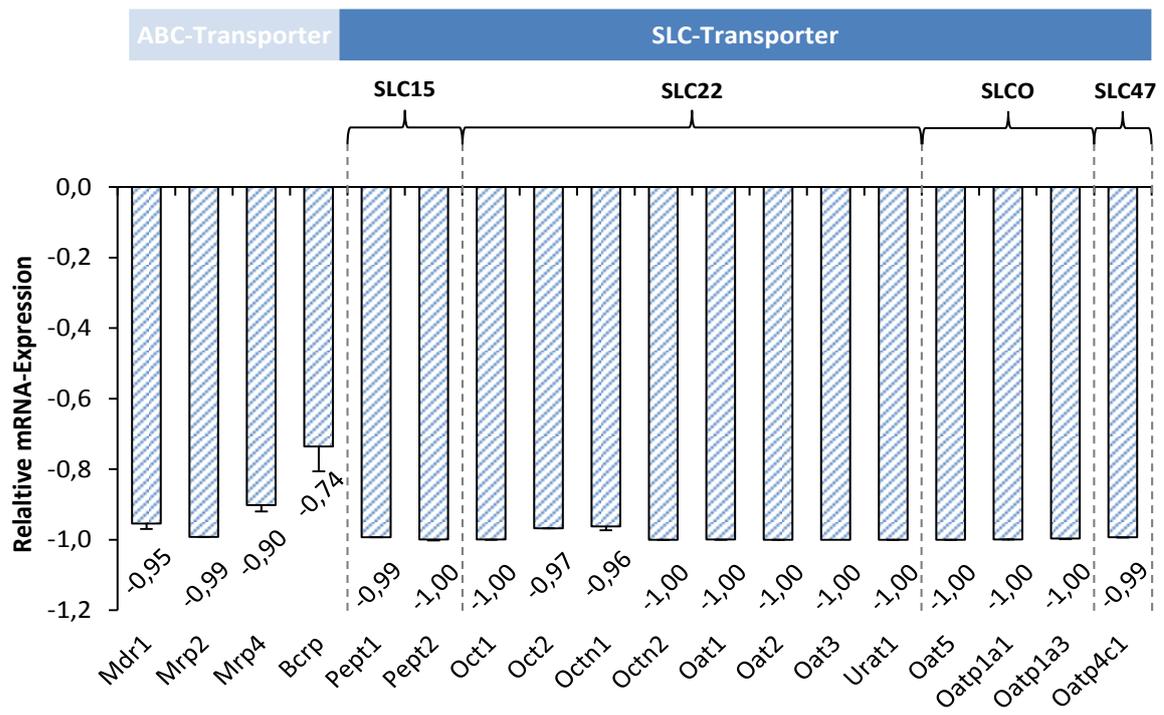
Die für 5 Tage kultivierten primären Nierenzellen wiesen ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster auf als die frisch isolierten primären Nierenzellen. Als einzige der untersuchten Zellen wiesen die kultivierten PRPTCs die höchste relative Expression für Bcrp (siehe Abbildung 2-24) auf. Auch Mrp4 war in geringen Mengen auffindbar. Außerdem nachgewiesen wurden geringe Mengen der organischen Kationen-Transporter Oct2 und Octn2 sowie von Mate1. Für alle anderen untersuchten Transporter konnte keine oder nur eine sehr geringe mRNA-Expression nachgewiesen werden.



**Abbildung 2-23: Relative mRNA-Expressionsdaten der untersuchten Transporter in PRPTCs nach 5 Tagen in Kultur.**

Die mRNA-Expressionen wurden auf die *Gapdh*-Expression in der jeweiligen Probe normalisiert und ist als  $2^{-(\Delta\Delta C_T)} \times 10^3$  angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. Sofern kein Wert angegeben ist befand sich die Expression unterhalb der Nachweisgrenze.

Im Vergleich mit den frisch isolierten PRPTCs zeigte sich also ein drastischer Unterschied der Expressionsmuster in den kultivierten PRPTCs. Um diesen Unterschied anschaulicher darzustellen, wurden die relativen Expressionen der frisch isolierten PRPTCs nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode als Bezugspunkt gesetzt. Pept1 wurde dabei nicht berücksichtigt, da es in beiden Fällen nicht detektiert werden konnte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2-24 zu sehen. Es ist zu erkennen, dass für alle untersuchten Transporter eine deutliche Herunterregulierung stattgefunden hat. Während dieser Effekt für Bcrp mit einer Verringerung der relativen Expression um 74 % noch am geringsten ausfiel, ging die gefundene Menge an mRNA innerhalb der Kulturperiode von 5 Tagen in allen anderen Fällen um 90–100 % zurück.



**Abbildung 2-24:** Relative mRNA-Expressionsdaten der untersuchten Transporter in PRPTCs nach 5 Tagen Kulturdauer im Vergleich zu den frisch isolierten PRPTCs.

Die mRNA-Expressionen wurden auf die *Gapdh*-Expression in der jeweiligen Probe normalisiert und auf die Expressionsstärke in den frisch isolierten PRPTCs bezogen, welche gleich 1 gesetzt wurde.

Tabelle 2-6: Übersicht über die relativen mRNA-Expressionsdaten der untersuchten Transporter.

Familie	Name	Gen	Zelllinien			Primärzellen	
			NRK-52E	IHKE-1	Caki-1	PRPTC frisch	PRPTC Kultur
ABC	<b>MDR1</b>	<i>Abcb1/ABCB1</i>	1,64	0,10	0,45	1,01	0,05
	<b>MRP2</b>	<i>Abcc2/ABCC2</i>	0,06	< NG	1,00	6,58	0,05
	<b>MRP4</b>	<i>Abcc4/ABCC4</i>	14,95	278,83	78,14	13,58	1,28
	<b>BCRP</b>	<i>Abcg2/ABCG2</i>	3,05	0,01	1,59	26,81	7,00
SLC15	<b>PEPT1</b>	<i>Slc15a1/SLC15A1</i>	< NG	< NG	0,07	< NG	< NG
	<b>PEPT2</b>	<i>Slc15a2/SLC15A2</i>	0,00	0,12	0,04	18,01	0,12
SLC22	<b>OCT1</b>	<i>Slc22a1/SLC22A1</i>	4,32	0,01	0,30	162,86	0,09
	<b>OCT2</b>	<i>Slc22a2/SLC22A2</i>	0,72	0,67	< NG	898,13	0,21
	<b>OCTN1</b>	<i>Slc22a4/SLC22A4</i>	0,03	19,29	34,56	1,58	0,05
	<b>OCTN2</b>	<i>Slc22a5/SLC22A5</i>	13,98	17,52	27,01	38,24	1,43
	<b>OAT1</b>	<i>Slc22a6/SLC22A6</i>	< NG	< NG	< NG	1070,26	< NG
	<b>OAT2</b>	<i>Slc22a7/SLC22A7</i>	0,03	< NG	0,00	7,40	0,00
	<b>OAT3</b>	<i>Slc22a8/SLC22A8</i>	0,00	< NG	< NG	28,04	0,01
	<b>OAT4</b>	<i>SLC22A9</i>	-	0,00	0,03	-	-
	<b>URAT1</b>	<i>SLC22A12</i>	< NG	< NG	< NG	0,45	< NG
	<b>OAT5</b>	<i>Slc22a24</i>	< NG	-	-	29,35	0,00
SLCO	<b>OATP1A1</b>	<i>Slco1a1</i>	0,00	-	-	23,75	0,00
	<b>OATP1A3</b>	<i>Slco1a3</i>	< NG	-	-	45,84	0,00
	<b>OATP4C1</b>	<i>Slco4c1/SLCO4C1</i>	< NG	4,12	6,20	13,75	0,04
SLC47	<b>MATE1</b>	<i>Slc47a1/SLC47A1</i>	0,27	4,88	7,46	65,16	0,45
	<b>MATE2-K</b>	<i>SLC47A2</i>	-	< NG	23,48	-	-

Die mRNA-Expressionen wurden auf die *GAPDH/Gapdh*-Expression in der jeweiligen Probe normalisiert und ist als  $2^{-(\Delta C_T)} \times 10^3$  angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Expression von OAT4 (*SLC22A9*) und MATE2-K (*SLC47A2*) wurde nur in humanen Zellen und die Expression von OAT5 (*Slc22a24*), OATP1A1 (*Slco1a1*) und OATP1A3 (*Slco1a3*) nur in Rattenzellen untersucht. < NG: Expression unterhalb der Nachweisgrenze. Expressionsstärke: niedrig  hoch

#### 2.4.2 Funktionelle Charakterisierung: Transport von prototypischen Substraten

Um zu klären, inwieweit das Vorhandensein der entsprechenden Transporter-mRNA auch Aussagen über dessen Funktionalität zulässt, wurde eine Serie von Transportstudien mit den unterschiedlichen Zellsystemen durchgeführt. Da die Sekretion von organischen Kationen und Anionen *in vivo* eine essentielle Aufgabe der proximalen Tubuli darstellt, wurde der Fokus der funktionellen Versuche darauf gelegt, inwieweit die verschiedenen Zellen diese Eigenschaft widerspiegeln. Im Folgenden werden die dafür in den Transportversuchen verwendeten Referenz-Substrate für den Transport organischer Kationen und Anionen kurz vorgestellt.

Die p-Aminohippursäure beziehungsweise deren Salz, das p-Aminohippurat (PAH), ist ein nicht-physiologisches Substrat für organische Anionen-Transporter, insbesondere für OAT1 (Takeda *et al.*, 2002). Die Strukturformel von PAH ist in Abbildung 2-25 dargestellt. Da es *in vivo* von den proximalen Tubuli aus dem Blut aufgenommen, aber auf apikaler Seite nicht reabsorbiert wird, wird PAH in der klinischen

Diagnostik auch zu Bestimmung des renalen Plasmaflusses eingesetzt (Reubi, 1953). Aufgrund dieser Eigenschaften findet es auch häufig Verwendung als typisches Substrat für renale Transportprozesse (Meier-Abt, 2002). PAH wurde in den Transportversuchen als Gemisch aus [ $^3\text{H}$ ]-markierter und nicht-markierter Substanz mit einer finalen Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$  eingesetzt.

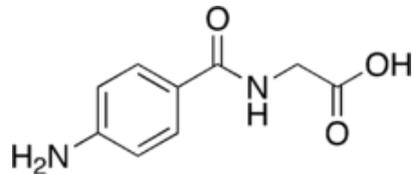


Abbildung 2-25: Strukturformel der p-Aminohippursäure (PAH)

Als typische Substrate für organische Kationen-Transporter wurden Tetraethylammoniumion (TEA) und 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP $^+$ ) verwendet. Bei TEA handelt es sich um ein Neurotoxin, welches von verschiedenen Aufnahme- und Efflux-Transportern als Substrat erkannt wird und eine besonders hohe Affinität zu OCT2 besitzt (Okuda *et al.*, 1999). Abbildung 2-26 zeigt die Strukturformel von TEA. TEA wurde als [ $^{14}\text{C}$ ]-markierte Substanz mit einer Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$  in den Versuchen eingesetzt.

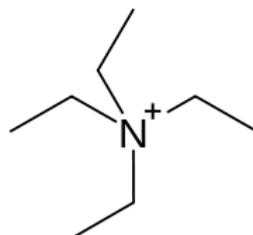


Abbildung 2-26: Strukturformel von Tetraethylammoniumion (TEA)

Ein weiteres Neurotoxin, 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP $^+$ ), wurde als zweite typische Testsubstanz für den Transport organischer Kationen eingesetzt. Abbildung 2-27 zeigt die Strukturformel von MPP $^+$ . Es wird hauptsächlich über OCT1 beziehungsweise OCT2 in die Zelle aufgenommen (Fukushima-Uesaka *et al.*, 2004). Für die Transportversuche wurde [ $^3\text{H}$ ]-markiertes und nicht-markiertes MPP $^+$  gemischt, um eine finale Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$  zu erreichen.

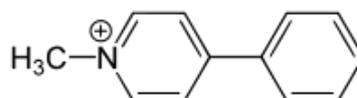
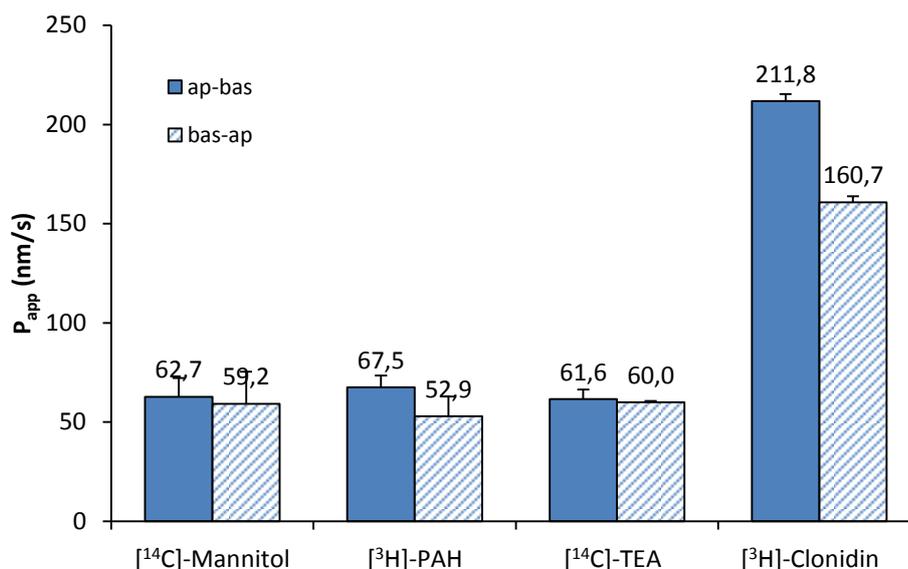


Abbildung 2-27: Strukturformel von 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP $^+$ )

#### 2.4.2.1 Bidirektionale Transportversuche mit PRPTC-Monolayern

In einer ersten Versuchsreihe wurden bidirektionale Transportstudien mit auf permeablen Membranfiltereinsätzen kultivierten PRPTCs durchgeführt, da nur diese Zellen eine geringe Mannitol-Permeabilität und somit eine ausreichende Dichtigkeit zeigten (siehe Kapitel 2.3.2.2). Für die Zelllinien NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1 wurden aufgrund der geringen Dichtigkeit keine entsprechenden Versuche durchgeführt. Zur Untersuchung der primären Nierenzellen aus dem Affen stand leider nicht ausreichend Material zur Verfügung. Als Testsubstanzen wurden PAH und TEA, sowie das hochpermeable Clonidin als Kontrolle eingesetzt. Die Versuche mit den radioaktiv markierten Substanzen wurden wie in Kapitel 1.9.2.1 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2-28 zusammengefasst. Zum besseren Vergleich sind die  $P_{app}$ -Werte für Mannitol aus Kapitel 2.3.2.2 erneut aufgetragen. Wie erwartet wurden für Clonidin in beide Transportrichtungen (ap-bas und bas-ap) hohe Permeationsgeschwindigkeiten von  $211,8 \pm 3,5$  und  $160,7 \pm 3,2$  nm/s gemessen. Im Gegensatz dazu zeigte sich sowohl für PAH als auch für TEA nur ein vergleichsweise geringer Substanzfluss. PAH permeierte mit einer Geschwindigkeit von  $67,5 \pm 6,0$  nm/s von apikal nach basolateral und mit  $52,9 \pm 10,1$  nm/s in umgekehrter Richtung. Die entsprechenden Werte für den TEA-Transport waren mit  $61,6 \pm 4,8$  nm/s (ap-bas) und  $60,0 \pm 0,7$  nm/s (bas-ap) etwa gleich hoch. Da sowohl die Permeationseigenschaften von PAH als auch von TEA mit denen von Mannitol vergleichbar sind, liegt die Vermutung nahe, dass lediglich passive parazelluläre Transportprozesse in den kultivierten primären proximalen Tubuluszellen abgebildet wurden. Dafür spricht auch der geringe zelluläre Widerfund, sowie der *Efflux Ratio* von etwa 1 (siehe Tabelle 2-7).



**Abbildung 2-28: Apparente Permeationskoeffizienten ( $P_{app}$ ) von [<sup>14</sup>C]-Mannitol, [<sup>3</sup>H]-PAH, [<sup>14</sup>C]-TEA und [<sup>3</sup>H]-Clonidin über die *Monolayer* der kultivierten PRPTCs.**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. Eingesetzt wurde 6  $\mu$ M [<sup>14</sup>C]-Mannitol (12,5 KBq/ml), 10  $\mu$ M PAH (0,15  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]-PAH, 25,0 KBq/ml), 10  $\mu$ M [<sup>14</sup>C]-TEA (1,25 KBq/ml) und 10  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]-Clonidin (25,0 KBq/ml). Die Inkubationszeit betrug 120 min. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 2-6 unabhängigen Versuchen.

**Tabelle 2-7: Ergebnisse der bidirektionalen Transportversuche mit [<sup>3</sup>H]-PAH, [<sup>14</sup>C]-TEA und [<sup>3</sup>H]-Clonidin in kultivierten PRPTCs.**

	[ <sup>3</sup> H]-PAH	[ <sup>14</sup> C]-TEA	[ <sup>3</sup> H]-Clonidin
<b>ap-bas</b>			
$P_{app}$ (nm/s)	67,5 $\pm$ 6,0	61,6 $\pm$ 4,8	211,8 $\pm$ 3,5
$WF_{Akz}$ (%)	10,8 $\pm$ 0,9	9,5 $\pm$ 0,7	31,8 $\pm$ 0,6
$WF_z$ (%)	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,4
$WF_{ges}$ (%)	99,7 $\pm$ 0,5	95,2 $\pm$ 1,6	93,0 $\pm$ 0,9
<b>bas-ap</b>			
$P_{app}$ (nm/s)	52,9 $\pm$ 10,1	60,0 $\pm$ 0,7	160,7 $\pm$ 3,2
$WF_{Akz}$ (%)	2,7 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,2
$WF_z$ (%)	0,6 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,0
$WF_{ges}$ (%)	95,0 $\pm$ 1,5	94,0 $\pm$ 1,2	92,3 $\pm$ 0,8
<b>Efflux Ratio</b>	<b>0,78</b>	<b>0,97</b>	<b>0,76</b>

$P_{app}$ : Apparenter Permeationskoeffizient,  $WF_{Akz}$ : Wiederfindung im Akzeptorkompartiment,  $WF_z$ : Wiederfindung in den lysierten Zellen,  $WF_{ges}$ : Wiederfindung gesamt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 2-3 unabhängigen Versuchen.

#### 2.4.2.2 Aufnahmeversuche mit kultivierten PRPTCs

Um das Transportverhalten prototypischer renaler Testsubstanzen in den PRPTCs eingehender zu charakterisieren, wurde die Aufnahme von PAH und MPP<sup>+</sup> in Abhängigkeit der Zeit sowie in An- und Abwesenheit spezifischer Inhibitoren untersucht. Zusätzlich erfolgten auch Aufnahmeversuche mit immortalisierten Nierenzelllinien, deren Ergebnisse dann mit denen der primären Nierenzellen

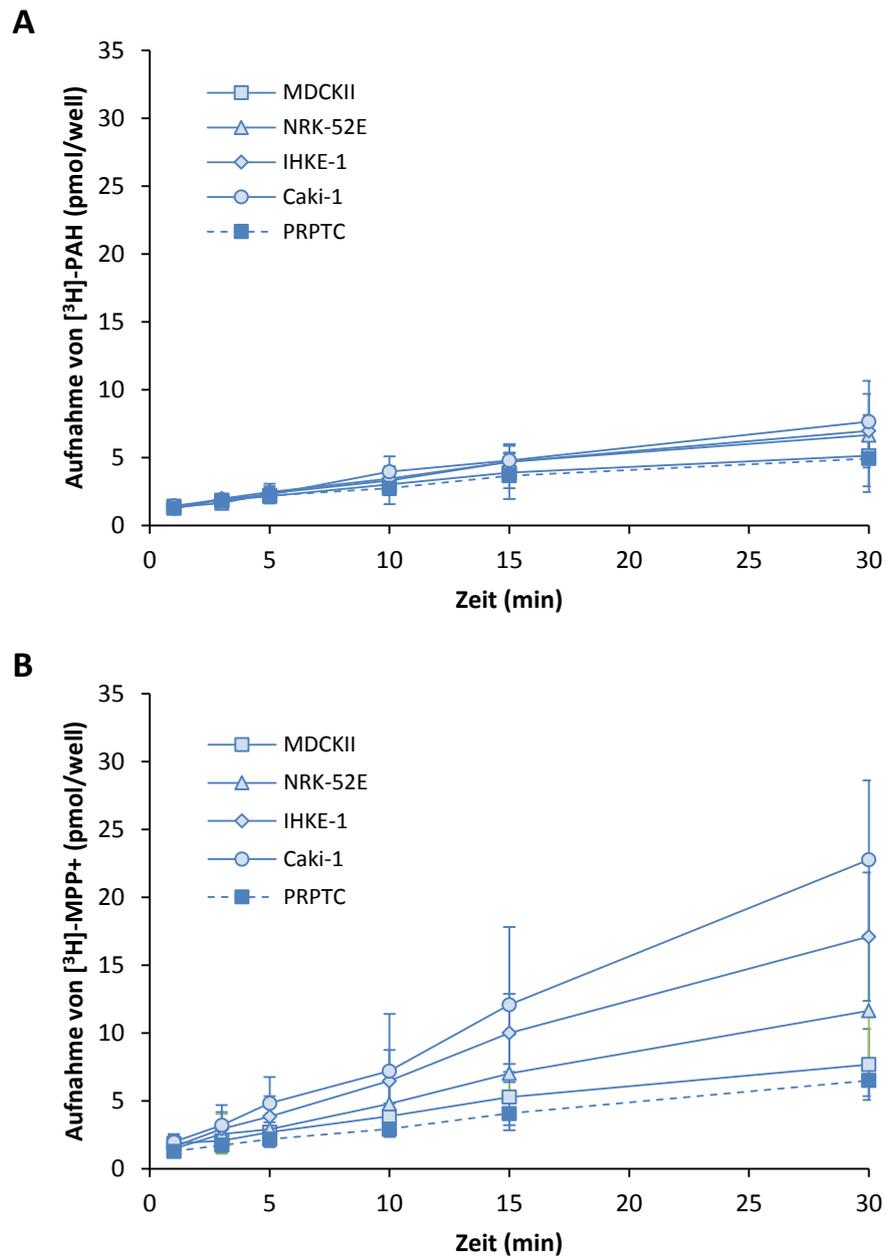
verglichen wurden. Alle Aufnahmeversuche wurden, wie in Kapitel 1.9.2.2 beschrieben, mit auf Zellkulturplatten kultivierten *Monolayern* durchgeführt.

Zunächst wurde die Aufnahme der anionischen Testsubstanz PAH in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 2-29 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass sowohl in allen untersuchten Nierenzelllinien als auch in den PRPTCs über einen Zeitraum von 30 Minuten ein leichter Anstieg der akkumulierten Substanzmenge messbar war. Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied in der aufgenommenen PAH-Menge zwischen den untersuchten Zellen festgestellt werden.

Um zu klären, inwieweit aktive Transportprozesse beteiligt sind, wurde im nächsten Schritt die Aufnahme von PAH in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren untersucht. Für die Inhibitionsversuche wurden eine Inkubationszeit von 5 min und eine Inhibitorkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  gewählt. Es wurde ein Set von Inhibitoren eingesetzt, für die aus der Literatur bekannt ist, dass sie die am PAH-Transport beteiligten Transporter (vor allem OAT1 und OAT3, sowie mit geringerer Affinität auch MRP1, MRP2 und MRP4) kompetitiv oder nicht-kompetitiv hemmen. Wie sich in Abbildung 2-30 zeigt, konnte die PAH-Aufnahme in den untersuchten Zellen jedoch mit keinem der eingesetzten Inhibitoren gehemmt werden. Dies deutet, wie auch schon die bidirektionalen Transportversuche mit PRPTC-*Monolayern* (siehe Kapitel 2.4.2.1) darauf hin, dass PAH von den kultivierten primären Nierenzellen nicht aktiv in die Zellen aufgenommen wird. Gleiches gilt für die untersuchten Zelllinien MDCKII, NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1, für die ebenfalls keine aktive PAH-Aufnahme nachgewiesen werden konnte.

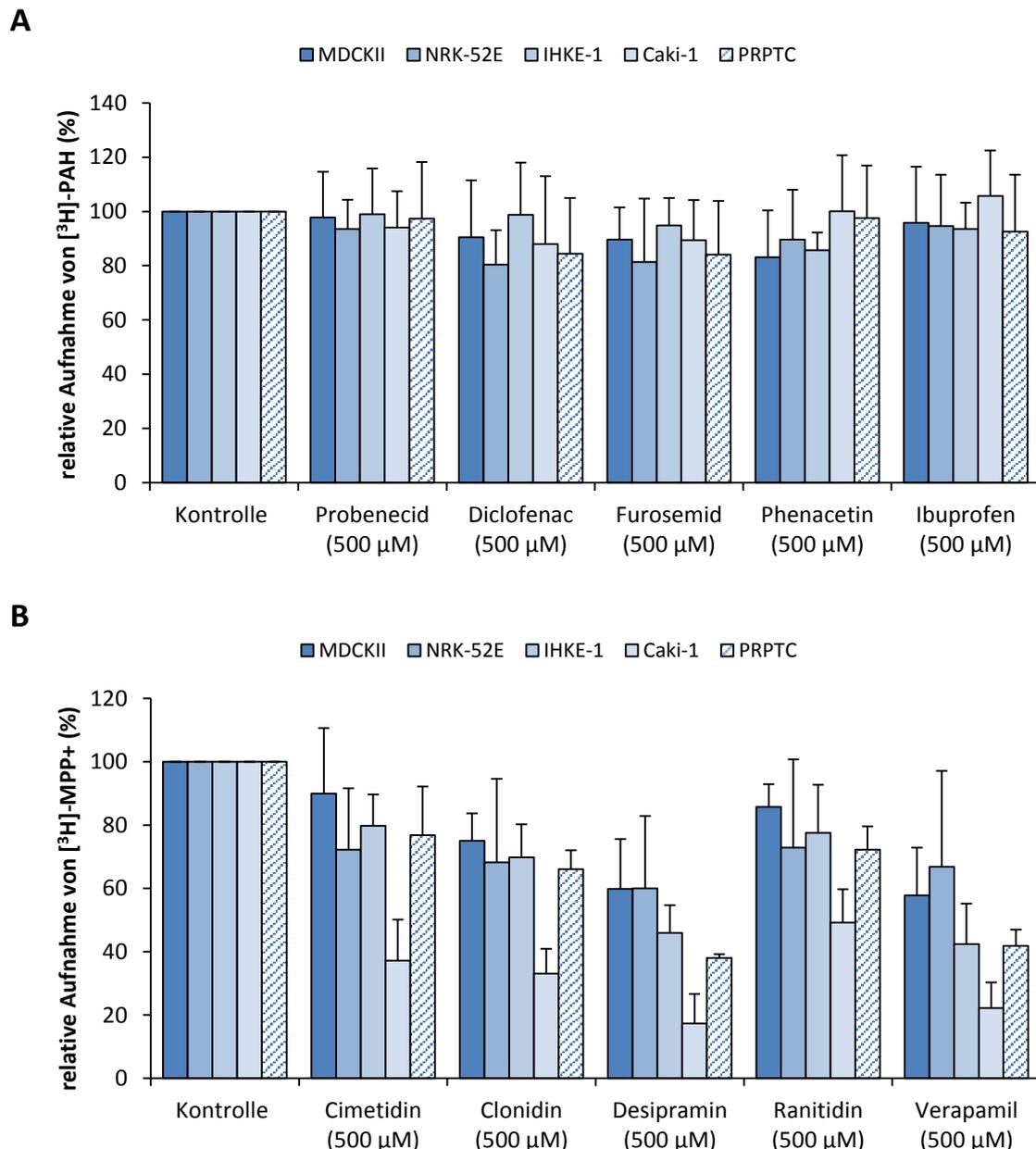
Um festzustellen, ob die als *Monolayer* kultivierten Zellen organische Kationen aktiv aufnehmen können, wurde die Aufnahme von MPP<sup>+</sup> in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2-29 abgebildet. Bei allen untersuchten Zellen ließ sich bis zum Ende der Inkubationszeit ein Anstieg der gemessenen Aktivität beobachten, wobei die Menge an aufgenommenem MPP<sup>+</sup> unterschiedlich hoch ausfiel. So hatten die Caki-1-Zellen mit  $22,8 \pm 5,8$  pmol/well nach 30 min am meisten Substanz aufgenommen, gefolgt von den IHKE-1-Zellen mit  $17,1 \pm 6,4$  pmol/well, sowie den NRK-52E-Zellen mit  $11,6 \pm 7,1$  pmol/well. Etwas weniger MPP<sup>+</sup> akkumulierte in den MDCKII-Zellen und in den PRPTCs, die sich mit einer Aufnahme von  $7,7 \pm 1,9$  pmol/well beziehungsweise  $6,5 \pm 1,2$  pmol/well etwa auf gleichem Niveau bewegten. Allerdings zeigte sich insbesondere bei den Caki-1- und IHKE-1-Zellen eine recht hohe Variation zwischen den einzelnen Versuchen. Analog zu den Aufnahmeversuchen mit PAH wurden auch die Transportversuche mit MPP<sup>+</sup> in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren für die potentiell an der Aufnahme beteiligten Transporter durchgeführt. In Abbildung 2-30 ist zu erkennen, dass sich die MPP<sup>+</sup>-Aufnahme durch Zugabe der Inhibitoren in unterschiedlichem Ausmaß hemmen ließ. In allen untersuchten Zellsystemen konnte die stärkste Inhibition mit Desipramin und Verapamil

gemessen werden, während die Effekte von Cimetidin, Ranitidin und Clonidin weniger ausgeprägt waren. In den MDCKII- und NRK-52E-Zellen fand im Vergleich die geringste Inhibition statt. Die maximalen Effekte wurden in MDCKII-Zellen mit Verapamil ( $42,2 \pm 15,0$  %) und in NRK-52E-Zellen mit Desipramin ( $40,0 \pm 22,8$  %) gemessen. In IHKE-1-Zellen wurde die MPP<sup>+</sup>-Aufnahme am wirkungsvollsten mit Verapamil ( $57,6 \pm 12,8$  %) und in PRPTCs mit Desipramin ( $62,0 \pm 1,2$  %) verringert. Den größten Einfluss hatte die Zugabe der Inhibitoren auf den MPP<sup>+</sup>-Transport in Caki-1-Zellen. Hier ließ sich die Aufnahme um  $77,8 \pm 8,0$  % (Verapamil) beziehungsweise  $82,7 \pm 9,4$  % (Desipramin) reduzieren.



**Abbildung 2-29: Zeitabhängige Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -PAH (A) und  $[^3\text{H}]$ -MPP+ (B) in die Nierenzelllinien und primären Nierenzellen.**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. Eingesetzt wurde  $10\ \mu\text{M}$  PAH ( $0,15\ \mu\text{M}$   $[^3\text{H}]$ -PAH,  $25,0\ \text{KBq/ml}$ ) sowie  $10\ \mu\text{M}$  MPP+ ( $8,1\ \text{nM}$   $[^3\text{H}]$ -MPP+,  $25,0\ \text{KBq/ml}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 2-30: Inhibitionsversuche der Aufnahme von  $[^3\text{H}]\text{-PAH}$  (A) und  $[^3\text{H}]\text{-MPP}^+$  (B) in die Nierenzelllinien und primären Nierenzellen.**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. Eingesetzt wurde 10  $\mu\text{M}$  PAH (0,15  $\mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{-PAH}$ , 25,0 KBq/ml) sowie 10  $\mu\text{M}$  MPP $^+$  (8,1 nM  $[^3\text{H}]\text{-MPP}^+$ , 25,0 KBq/ml). Die Inkubationszeit betrug 5 min. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

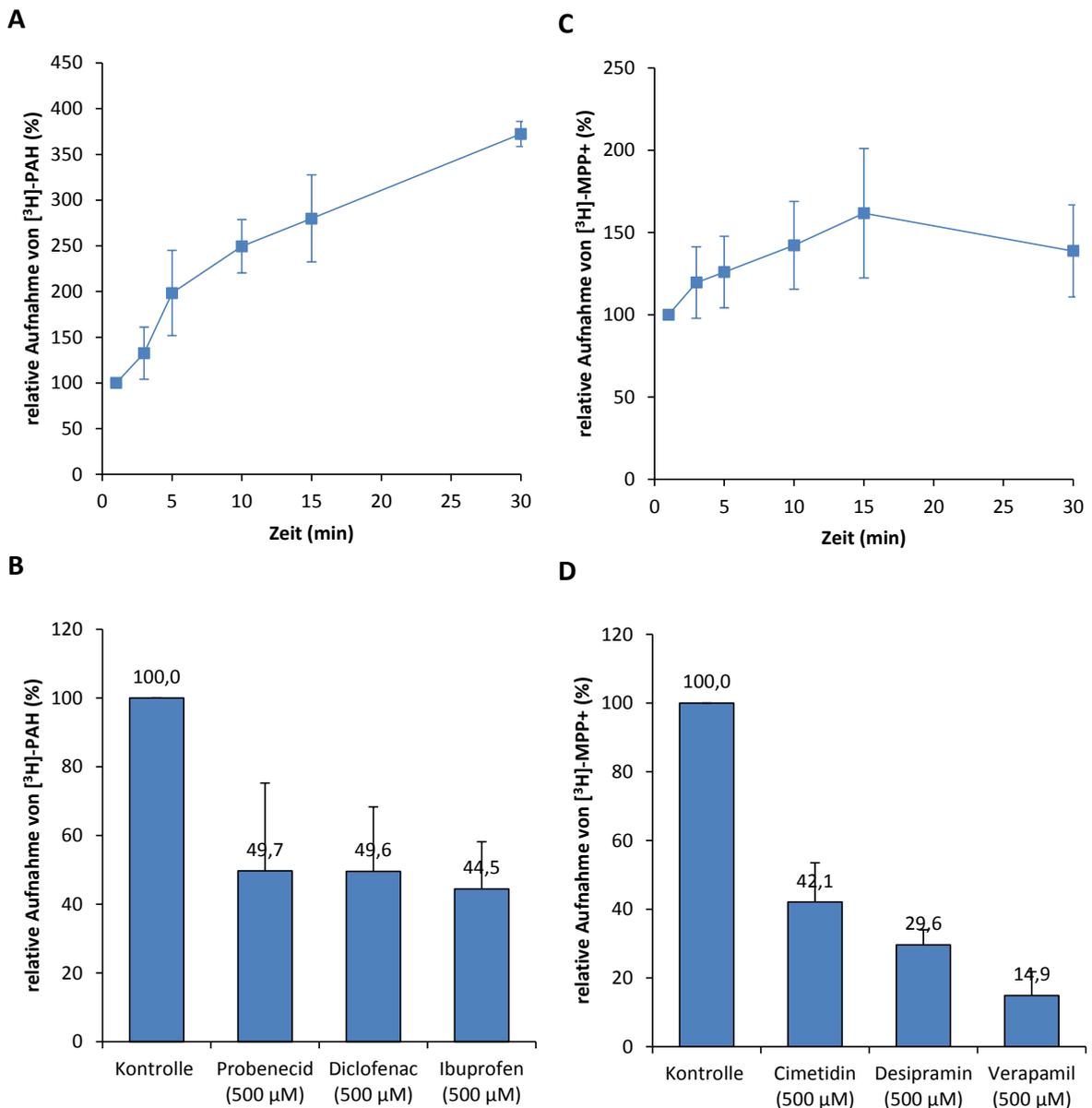
#### 2.4.2.3 Aufnahmeversuche mit frisch isolierten PRPTCs in Suspension

Wie aus den Aufnahmeversuchen mit den kultivierten Zellen hervorgeht, weisen die kultivierten PRPTCs keinen aktiven Transport von PAH auf und zeigen nur eine geringe aktive Aufnahme von MPP $^+$ . Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Ergebnissen der mRNA-Expressionsanalysen, bei denen nur sehr niedrige Expressionslevel der untersuchten Aufnahmetransporter detektiert werden konnten (siehe Kapitel 2.4.1). Im Gegensatz zu den als dichtem *Monolayer* kultivierten PRPTCs, konnte in den

frisch aus der Niere isolierten PRPTCs die Expression einer Vielzahl von Transportern, insbesondere von OCT2 und OAT1, dargestellt werden. Es stellte sich daher die Frage, ob die in den frisch isolierten PRPTCs auf mRNA-Ebene gefundenen Transporter auch funktionsfähig sind. Um dies zu überprüfen wurden mit den frisch isolierten PRPTCs Aufnahmeversuche in Form eines Suspensions-Assays wie in Kapitel 1.9.2.3 beschrieben durchgeführt. In den Versuchen wurden, ebenso wie in den Aufnahmeversuchen mit den kultivierten PRPTCs, die beiden Testsubstanzen PAH und MPP+ verwendet. Für die Inhibitionsversuche kam dabei jeweils eine Auswahl der in Kapitel 2.4.2.2 verwendeten Inhibitoren zum Einsatz.

Abbildung 2-31 zeigt die Ergebnisse der zeitabhängigen PAH-Aufnahme in An- und Abwesenheit verschiedener Inhibitoren. Wie dort zu erkennen ist, zeigte sich eine zeitabhängige Aufnahme von PAH in die Zellen, wobei die in den Zellen akkumulierte Menge an PAH mit zunehmender Inkubationsdauer anstieg und nach 30 min  $372,4 \pm 13,8$  % des Ausgangswertes nach 1 min betrug. Für die folgenden Inhibitionsversuche wurde eine Inkubationszeit von 5 min gewählt, in der sich der Transport innerhalb der linearen Phase befand. Die Aufnahme war durch alle eingesetzten Inhibitoren in etwa gleicher Höhe hemmbar. So wurde der PAH-Transport in die Zellen in Anwesenheit von 500  $\mu$ M Probenecid um  $50,3 \pm 25,6$  % verringert. Eine ebenso starke Inhibition ( $50,4 \pm 18,7$  %) wurde durch die Zugabe von 500  $\mu$ M Diclofenac erreicht und mit Ibuprofen konnte die PAH-Aufnahme um  $55,5 \pm 13,7$  % des Kontrollwertes verringert werden.

Für MPP+ konnte ebenfalls ein zeitabhängiger, intrazellulärer Anstieg der Menge an Testsubstanz detektiert werden (siehe Abbildung 2-31). Allerdings konnte im Unterschied zu den Versuchen mit PAH eine Sättigung der Aufnahme nach etwa 15 min beobachtet werden. Der Transport konnte durch Zugabe der Inhibitoren Cimetidin, Desipramin und Verapamil gehemmt werden. Letzteres zeigte dabei mit einer Inhibition von  $85,1 \pm 6,9$  % den stärksten Effekt, gefolgt von Desipramin ( $70,4 \pm 4,4$  %) und Cimetidin ( $57,9 \pm 11,3$  %).



**Abbildung 2-31: Zeitabhängige Aufnahme von  $[^3\text{H}]\text{-PAH}$  (A-B) und  $[^3\text{H}]\text{-MPP+}$  (C-D) in die frischen Primärzellen.**

A, B: Zeitabhängige Aufnahme von  $[^3\text{H}]\text{-PAH}$  in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) spezifischer Inhibitoren. Eingesetzt wurde 10  $\mu\text{M}$  PAH (0,15  $\mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{-PAH}$ , 25,0 KBq/ml), die Inkubationszeit in (B) betrug 5 min. C, D: Zeitabhängige Aufnahme von  $[^3\text{H}]\text{-MPP+}$  in Abwesenheit (C) und Anwesenheit (D) spezifischer Inhibitoren. Eingesetzt wurde 10  $\mu\text{M}$  MPP+ (8,1 nM  $[^3\text{H}]\text{-MPP+}$ , 25,0 KBq/ml), die Inkubationszeit in (D) betrug 5 min. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

## 2.5 REGULATION DER TRANSPORTER-EXPRESSION

Durch die Charakterisierung der Transporteigenschaften der PRPTCs konnte gezeigt werden, dass diese unter den angewendeten Kulturbedingungen dedifferenzieren und nach 5 Tagen, im Gegensatz zu den frisch isolierten PRPTCs, nur noch eine minimale Menge an Transporter-mRNA besitzen, was sich auch in einer stark verringerte Transportaktivität übersetzte. Es stellte sich daher die Frage, inwieweit es

möglich ist, diesem Dedifferenzierungsprozess entgegenzusteuern, beziehungsweise ob die Transporter-Aktivität in den kultivierten Zellen aufrechterhalten oder zumindest teilweise wiederhergestellt werden kann. Es ist bekannt, dass eine Reihe von Signalwegen an der Organogenese der Niere sowie an der terminalen Differenzierung der renalen Epithelzellen beteiligt sind (Reidy and Rosenblum, 2009). So scheint dabei insbesondere der kanonische Wnt-Signalweg (Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg) und der *Notch*-Signalweg eine wichtige Rolle zu spielen (Pulkkinen *et al.*, 2008). Auch für mehrere Wachstumsfaktoren und Steroidhormone ist eine Beteiligung an der Zelldifferenzierung in der Niere beschrieben (El-Dahr *et al.*, 2008). Vor diesem Hintergrund wurden daher einige bekannte Modulatoren der beiden Signalwege sowie verschiedene Wachstumsfaktoren und Steroidhormone ausgewählt, um deren Auswirkung auf die Transporteigenschaften der kultivierten PRPTCs zu analysieren. Dadurch sollte zunächst auf funktioneller Ebene überprüft werden, ob eine Hoch- oder Herunterregulierung der Transporter-Expression stattgefunden hat. Zur Modulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs kam dabei 6-Bromoindirubin-3'-Oxim (BIO) als Signal-aktivierende, sowie *endo-interacting with RNA polymerase II protein 1* (endo-IWR-1) als Signal-inhibierende Substanz zum Einsatz (Chen *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009). Um den *Notch*-Signalweg zu modulieren wurde N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-Alanyl]-S-Phenylglycine-t-Butylester (DAPT) zur Aktivierung und Resveratrol zur Inhibition verwendet (Pinchot *et al.*, 2011; Geling *et al.*, 2002). Des Weiteren wurden die Wachstumsfaktoren HGF, FGF-1, EGF, IGF-1 jeweils einzeln und in Kombination als Wachstumsfaktor-Mix, sowie die beiden Steroide Testosteron und Hydrocortison eingesetzt. Ebenfalls untersucht wurde die Wirkung von Kreatinin, welches als harnpflichtiges Stoffwechselprodukt ständig in Kontakt mit den Zellen des proximalen Tubulus steht und möglicherweise einen regulativen Effekt haben könnte.

Für die Versuche wurden die Zellen in Anwesenheit der ausgewählten Substanzen und Wachstumsfaktoren in jeweils zwei Konzentrationen kultiviert (siehe Tabelle 2-8). Die anschließenden Aufnahmeversuche mit [ $^3\text{H}$ ]-PAH und [ $^3\text{H}$ ]-MPP+ fanden analog zu den in Kapitel 2.4.2.2 durchgeführten Versuchen statt. Als Kontrolle wurde in jedem Versuch ein Doppelwert von nur mit Lösemittel (DMSO oder ddH<sub>2</sub>O) behandelten Zellen mitgeführt. Die in den Proben gemessene Aktivität wurde auf diesen Ansatz bezogen und ist als Prozent der Kontrolle angegeben.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 2-8 dargestellt. Generell lässt sich zunächst sagen, dass die beobachteten Effekte in den meisten Fällen eher gering ausfallen. Im Falle der Modulatoren des kanonischen Wnt-Signalwegs zeigten sich für den Aktivator BIO kein Effekt auf die Aufnahme von PAH oder MPP+ in die PRPTCs. Für endo-IWR 1, welches inhibitorisch auf den Signalweg wirkt, konnte eine verminderte Aufnahme von MPP+ festgestellt werden: Nach kontinuierlicher Behandlung der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  endo-IWR 1 konnte nur noch  $43,2 \pm 1,7\%$  MPP+ in den Zellen nachgewiesen werden ( $38,6 \pm 3,1\%$  nach der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  endo-IWR 1). Die Behandlung mit dem *Notch*-Aktivator DAPT (1  $\mu\text{M}$ )

fürte hingegen zu einer leichten Erhöhung der Aufnahme von PAH ( $142,00 \pm 12,8$  % gegenüber der unbehandelten Kontrolle). Ein etwas geringerer Effekt konnte für  $10 \mu\text{M}$  DAPT beobachtet werden, hier lag der Effekt noch bei  $126,3 \pm 2,6$  %. Die Zugabe von Resveratrol, welches hemmend auf den *Notch*-Signalweg wirkt, führte nur zu geringeren Schwankungen der Aufnahme von PAH und MPP+. Ebenfalls nur geringe Effekte konnten durch die Behandlung der Zellen mit den Steroidhormonen Testosteron und Hydrocortison nachgewiesen werden. Bei den Wachstumsfaktoren fiel eine erhöhte Aufnahme von PAH und MPP+ nach Behandlung mit  $10 \text{ ng/ml}$  EGF ( $131,5 \pm 19,3$  % beziehungsweise  $136,2 \pm 22,9$  %), sowie eine Erhöhung der PAH-Aufnahme nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor-Mix um  $145,1 \pm 14,8$  % auf. Der stärkste beobachtete Effekt wurde durch Kreatinin in einer Konzentration von  $25 \text{ mM}$  hervorgerufen. Die so behandelten PRPTCs nahmen deutlich mehr MPP+ auf als die unbehandelten Kontrollen. Die MPP+-Aufnahme wurde in diesem Fall auf  $176,0 \pm 8,1$  % erhöht.

**Tabelle 2-8: Übersicht über die Ergebnisse der Aufnahmeversuche mit kultivierten PRPTCs in Anwesenheit verschiedener potentieller Regulatoren.**

Kategorie	Substanz	Konzentration	Aufnahme [ <sup>3</sup> H]-PAH (% Kontrolle)	Aufnahme [ <sup>3</sup> H]-MPP+ (% Kontrolle)
Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg	BIO	$1 \mu\text{M}$	$106,5 \pm 2,5$	$86,2 \pm 1,9$
		$2 \mu\text{M}$	$91,8 \pm 1,2$	$92,5 \pm 13,6$
	endo-IWR-1	$1 \mu\text{M}$	$98,3 \pm 1,1$	$43,2 \pm 1,7$
<i>Notch</i> -Signalweg	DAPT	$1 \mu\text{M}$	$142,0 \pm 12,8$	$108,0 \pm 5,3$
		$10 \mu\text{M}$	$126,3 \pm 2,6$	$91,4 \pm 4,7$
	Resveratrol	$1 \mu\text{M}$	$117,9 \pm 6,4$	$89,3 \pm 3,8$
Steroidhormone	Testosteron	$1 \mu\text{M}$	$101,2 \pm 3,2$	$92,2 \pm 2,1$
		$10 \mu\text{M}$	$98,1 \pm 10,4$	$89,6 \pm 3,7$
	Hydrocortison	$1 \mu\text{M}$	$107,3 \pm 3,1$	$113,1 \pm 21,6$
Wachstumsfaktoren	HGF	$1 \text{ ng/ml}$	$119,5 \pm 9,9$	$103,6 \pm 7,7$
		$10 \text{ ng/ml}$	$126,0 \pm 0,9$	$106,9 \pm 3,0$
	FGF-1	$1 \text{ ng/ml}$	$124,0 \pm 7,4$	$106,5 \pm 14,5$
		$10 \text{ ng/ml}$	$112,0 \pm 28,4$	$91,2 \pm 19,00$
	EGF	$1 \text{ ng/ml}$	$106,3 \pm 9,9$	$99,7 \pm 2,4$
		$10 \text{ ng/ml}$	$131,5 \pm 19,3$	$136,2 \pm 22,9$
	IGF-1	$1 \text{ ng/ml}$	$112,1 \pm 9,2$	$106,4 \pm 6,5$
	$10 \text{ ng/ml}$	$108,7 \pm 7,7$	$103,6 \pm 9,6$	
	Mix	$145,1 \pm 14,8$	$114,7 \pm 14,3$	
Sonstiges	Kreatinin	$5 \text{ mM}$	$95,7 \pm 12,8$	$112,3 \pm 0,7$
		$25 \text{ mM}$	$110,3 \pm 12,2$	$176,0 \pm 8,1$

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen für 5 Tage. Als Substrate wurden  $10 \mu\text{M}$  PAH ( $0,15 \mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H]-PAH,  $25,0 \text{ KBq/ml}$ ) sowie  $10 \mu\text{M}$  MPP+ ( $8,1 \text{ nM}$  [<sup>3</sup>H]-MPP+,  $25,0 \text{ KBq/ml}$ ) eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 2 unabhängigen Versuchen.

### 3 DISKUSSION

---

Die Nieren spielen eine entscheidende Rolle bei der Elimination einer Vielzahl von Abfallprodukten des Stoffwechsels, sowie vieler verschiedener Xenobiotika und deren Metaboliten. So werden 32 % der 200 im Jahr 2010 meistverschriebenen am Markt befindlichen Arzneistoffe renal eliminiert (Morrissey *et al.*, 2013). Seit längerem ist bekannt, dass neben der rein passiven glomerulären Filtration vor allem die aktive, Transporter-vermittelte tubuläre Sekretion entscheidend an der Exkretion vieler therapeutisch wirksamer Arzneistoffe beteiligt ist. Dies ist bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe aufgrund der dadurch potentiell möglichen Wechselwirkungen eines Wirkstoffs mit den renalen Arzneistofftransportern von großer Relevanz. So kann es durch Interaktionen eines Wirkstoffs mit den in den proximalen Tubuluszellen exprimierten Transportern zu einer Beeinträchtigung der renalen Eliminierung eines simultan verabreichten Wirkstoffs kommen. Dies kann wiederum eine Veränderung von dessen Plasmakonzentration mit entsprechenden klinisch relevanten Auswirkungen zur Folge haben kann. Zahlreiche in klinischen Studien beobachtete Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen werden heute auf derartige renale Transporter-Interaktionen zurückgeführt (Bleasby *et al.*, 2006; Lepist and Ray, 2012; Morrissey *et al.*, 2013; Perri *et al.*, 2003).

Die renale Exkretionsrate kann nicht nur durch Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen sondern auch durch Änderungen des Expressions- und Aktivitätslevel einzelner Arzneistofftransporter durch genetische Faktoren, wie etwa Polymorphismen, beeinflusst werden. Zudem sind in der Literatur zahlreiche Beispiele zu finden, in denen die renale Exkretionsrate verschiedener Arzneistoffe durch unterschiedliche Faktoren wie Erkrankungen der Niere, Alter, Schwangerschaft, Geschlecht oder Ethnizität beeinflusst wird (Morrissey *et al.*, 2013).

Aus den genannten Gründen ist die Identifizierung der renalen Eliminationswege von Arzneistoffen von großer Relevanz. Wird während der Entwicklung eines Wirkstoffs festgestellt, dass dieser renal eliminiert wird, ist es bereits während der frühen Phase der Entwicklung von großer Bedeutung, den genauen Weg der Eliminierung, beziehungsweise die für den Transport verantwortlichen Transportproteine, zu identifizieren. Ein geeignetes *In-vitro*-Modell zur Vorhersage der Transporteigenschaften eines Wirkstoffs in den proximalen Tubuli könnte dazu entscheidend beitragen. Zusammen mit dem Wissen um die therapeutische Plasmakonzentration der entsprechenden Substanz würde ein derartiges Modell die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens und des Ausmaßes von Transporter-vermittelten Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen in der Niere ermöglichen (Li *et al.*, 2006).

Während für viele der einzelnen in den proximalen Tubuluszellen exprimierten Arzneistofftransporter bereits gut etablierte Modellsysteme, etwa in Form von Zellmodellen, die den rekombinanten Transporter exprimieren, existieren, fehlt es an einem geeignetem Modell, das das Zusammenspiel aller

Transporter beziehungsweise das Absorptionsprofil der proximalen Tubuluszellen *in vivo* hinreichend genau voraussagt. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, ein Zellmodell zu etablieren, welches eine möglichst genaue Untersuchung der tubulären Transportvorgänge erlaubt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene renale Zellsysteme hinsichtlich ihrer Barriere- und Transporteigenschaften charakterisiert und verglichen. Das Hauptziel war es dabei, ein Modell zu finden, das die ursprünglichen Eigenschaften der proximalen Tubuluszellen *in vivo*, insbesondere bezüglich deren sekretorischer und reabsorptiver Funktion, möglichst gut widerspiegelt. Die idealen Anforderungen an ein solches Modell beinhalten vor allem 1) eine dem *In-vivo*-Gewebe möglichst ähnliche Morphologie und polare Architektur der Zellen, 2) die Expression PT-typischer Antigen- und Enzym-Differenzierungsmarker, 3) vergleichbare transepitheliale elektrophysiologische Eigenschaften, insbesondere funktionelle *Tight Junctions*, sowie 4) die funktionelle Expression und Aktivität PT-typischer Aufnahme- und Efflux-Transporter.

### 3.1 AUSWAHL DER ZELLMODELLE

Für die *In-vitro*-Evaluierung von renalen Funktionen wurden in der Vergangenheit verschiedene zellbasierte Modellsysteme, sowohl primäre Nierenzellen als auch renale Zelllinien, herangezogen. Sowohl Primärzellen als auch immortalisierte Zelllinien haben jedoch eine Reihe von Vor- und Nachteilen. Welches System besser geeignet ist, hängt stark von der jeweiligen Fragestellung ab. So reflektieren primäre Zellkulturen häufig besser die physiologische *In-vivo*-Situation als immortalisierte Zelllinien. Allerdings ist die unbegrenzte Lebensspanne, die schnelle Verfügbarkeit und die relativ einfache Kultivierung von renalen Zelllinien ein klarer Vorteil gegenüber primären renalen Zellen, die erst durch eine aufwendige Isolationsmethode gewonnen werden müssen. Für proximale Tubuluszellen sind zahlreiche Isolationsmethoden aus den Nieren verschiedener Spezies, etwa aus dem Kaninchen, der Ratte, dem Affen oder dem Menschen beschrieben. Die aus dem Kaninchen isolierten Zellen lassen sich relativ gut kultivieren und wurden daher bereits eingehend charakterisiert (Chung *et al.*, 1982; Genestie *et al.*, 1997; Jans *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 1992; Lash *et al.*, 1995; Taub *et al.*, 1989; Toutain *et al.*, 1991). Die Kultivierung primärer Nierenzellen aus dem Menschen, dem Affen und der Ratte ist allerdings schwieriger und erste Erfolge wurden erst in den letzten Jahren verzeichnet. Primärzellen spiegeln zu meist die *In-vivo*-Situation am besten wieder, können jedoch unter Kulturbedingungen mitunter stark dedifferenzieren. Weiterhin existieren eine Reihe etablierter immortalisierter Zelllinien renalen Ursprungs, wie etwa MDCKI und MDCKII, LLC-PK1 und *Opossum kidney*-Zellen (OK-Zellen). Der Vorteil der Zelllinien liegt in der unbegrenzten Lebensspanne und der schnellen Verfügbarkeit, allerdings zeigen derartige Zelllinien häufig atypische Eigenschaften im Vergleich zum Ursprungsgewebe. Bei den genannten Zelllinien handelt es sich um weitverbreitete Zellmodelle, die durch spontan erworbene Immortalisierung entstanden sind. Der exakte Ursprung der Zellen, das heißt das Tubulus-Segment aus dem die Zelllinie hervorgegangen ist, ist oft nicht genau bekannt (Jennings *et al.*, 2008). Die MDCKII-

Zelllinie entstammt dem Hund und ist mit am besten charakterisiert. Die porcine LLC-PK1-Zelllinie und die OK-Zellen sind weit verbreitete Modelle, die beispielsweise in Studien zur renalen Physiologie oder zur Nephrotoxizität, als Modell proximaler Tubuli eingesetzt werden (Steinmassl *et al.*, 1995; Diemert *et al.*, 1995; Endo *et al.*, 2000; Fishman *et al.*, 2012; Rothenbacher *et al.*, 1998). Es hat sich jedoch gezeigt, dass beide Zelllinien deutliche Unterschiede zu den proximalen Tubuli aufweisen. So sind beispielsweise typische Marker-Enzyme der proximalen Tubuli nicht exprimiert. Beide Zelllinien sind durch das Fehlen der Fructose-1, 6-bisphosphatase auch nicht in der Lage, die für die proximalen Tubuluszellen typische Glukoneogenese zu betreiben. OK-Zellen zeigen darüber hinaus nur eine sehr geringe Expression der beiden PT-typischen Enzyme  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 und alkaline Phosphatase. Obwohl Hori *et al.* in OK-Zellen den Transport des prototypischen organischen Kations und OAT-Substrats p-Aminohippurat (PAH) beschrieben hat (Hori *et al.*, 1993), konnten weitere renale Transporter nicht nachgewiesen werden (Jenkinson *et al.*, 2012). Für die LLC-PK1-Zelllinie ist bereits bekannt, dass sie generell nur eine niedrige Transporter-Expression aufweist, weshalb die Zellen häufig als Wirtszellen für die Transfektion humaner Transporter verwendet werden (Giacomini *et al.*, 2010; Iwai *et al.*, 2011; Morita *et al.*, 2001; Spears *et al.*, 2005). Bereits 1989 publizierte Fauth *et al.*, dass LLC-PK1-Zellen kein Transportsystem für organische Anionen besitzen (Fauth *et al.*, 1988). Darüber hinaus entstammen LLC-PK1- und OK-Zellen Spezies (Schwein beziehungsweise Opossum), die für die präklinische Arzneimittelentwicklung nur von geringer Bedeutung sind. Aus den oben genannten Gründen wurden diese beiden Zelllinien nicht in die Untersuchungen, die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, miteinbezogen.

Sowohl für die Ratte, dem Standardtiermodell der Pharmakokinetik, als auch für den Menschen existieren ebenfalls immortalisierte renale Zellmodelle. Ein bekannte Zelllinie aus der Ratte ist NRK-52E, für die bisher allerdings nur die Expression und Aktivität einiger einzelner Arzneistofftransporter untersucht wurde (Lash *et al.*, 2007; van de Water *et al.*, 2007). Eine weit verbreitete humane Zelllinie renalen Ursprungs ist die *Human embryonic kidney* 293 (HEK293) Zelllinie, die allerdings aufgrund ihrer embryonalen Herkunft nur eine begrenzte Aussagekraft in Bezug auf den erwachsenen Menschen hat. Weitere kommerziell erhältliche humane Zelllinien aus dem proximalen Tubulus sind etwa *Human kidney-2* (HK-2), *Carcinoma kidney-1* (Caki-1) und *Immortalized human kidney epithelial* 1 (IHKE-1). Für die HK-2-Zelllinie wurde vor kurzem durch Jenkinson *et al.* beschrieben, dass die Zellen nur sehr bedingt den Arzneistofftransport in den proximalen Tubuli widerspiegeln. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen zwar MDR1 und zumindest einen der relevanten MRP-Transporter, aber keinerlei Aufnahmetransporter aus der *SLC22*-Familie wie OAT1, OAT3 oder OCT2 exprimieren (Jenkinson *et al.*, 2012). Daher wurde diese Zelllinie nicht in die Untersuchungen mit einbezogen. Hingegen konnte Glube *et al.* für die Caki-1-Zelllinie Tubuli-typische Charakteristika, sowie eine OCTN2- und OCT3-Aktivität demonstrieren, wodurch sich diese Zelllinie für weiterführende Untersuchungen, die im Rahmen dieser

Arbeit durchgeführt wurden, qualifizierte (Glube *et al.*, 2007a, 2007b; Glube and Langguth, 2008). Auch für die IHKE-1-Zelllinie wurden vereinzelt Hinweise auf Ähnlichkeiten zu proximalen Tubuli *in vivo*, wie etwa bezüglich deren Morphologie und Aminosäure-Transporteigenschaften, gefunden (Hirsch *et al.*, 1998; Hohage *et al.*, 1998). Die Transporteigenschaften dieser Zellen wurden bisher aber noch nicht eingehend untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die genannten renalen Zellen Informationen zur Expression und/oder Aktivität von Arzneistoff-Transportern in der Literatur nur sehr eingeschränkt vorhanden sind. Um die Frage zu klären, inwieweit die Zellen die Transporteigenschaften proximaler Tubuluszellen widerspiegeln, wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit die Transport- und Barriere-Eigenschaften dieser Zellen ausführlich charakterisiert. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Zellmodelle ist in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

**Tabelle 3-1: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Zellmodelle**

	<b>Name</b>	<b>Spezies</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Typ</b>
<b>MDCKII</b>	<i>Madin-Darby canine kidney II</i>	Hund	Nierenepithel	immortalisiert
<b>NRK-52E</b>	<i>Normal rat kidney-52E</i>	Ratte	Nierenepithel	immortalisiert
<b>IHKE-1</b>	<i>Immortalized human kidney epithelial-1</i>	Mensch	Nierenkortex (fötal)	immortalisiert
<b>Caki-1</b>	<i>Carcinoma kidney-1</i>	Mensch	Nierenkarzinom	immortalisiert
<b>PRPTC</b>	<i>Primary rat proximal tubule cells</i>	Ratte	proximaler Tubulus	primär
<b>PMPTC</b>	<i>Primary monkey proximal tubule cells</i>	Affe	proximaler Tubulus	primär

### 3.2 ISOLATION UND KULTIVIERUNG PRIMÄRER PROXIMALER TUBULUSZELLEN

Die Nieren sind im Vergleich zu anderen Organen, wie etwa der Leber, hochkomplex aufgebaut. Auch deren funktionelle Grundeinheit, die Nephronen, bestehen neben den proximalen Tubuluszellen, aus mindestens 15 weiteren spezialisierten Zelltypen (Baer *et al.*, 1997). Um die spezifischen Eigenschaften der proximalen Tubuluszellen zu untersuchen, ist deswegen zunächst deren Isolation aus der Niere erforderlich. In der Literatur sind bereits eine Reihe von Isolationsmethoden für proximale Tubuluszellen aus unterschiedlichen Spezies durch verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben. Aufgrund der Tatsache, dass die Ratte in präklinischen pharmakokinetischen Studien das verbreitetste Versuchstier ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Isolation und Kultivierung primärer proximaler Tubuluszellen aus der Ratte etabliert. Das Ziel war dabei zunächst eine geeignete Isolationsmethode zu identifizieren, welche die Gewinnung der Zellen in hinreichender Reinheit bei ausreichender Zellausbeute erlaubt.

### 3.2.1 Überlegungen zur Isolationsmethode

In den in der Literatur beschriebenen Isolationsmethoden wurden als Donor-Tiere Ratten unterschiedlicher Stämme eingesetzt. Da auch innerhalb einer Spezies möglicherweise relevante Unterschiede in Anatomie und Physiologie vorhanden sein können, wurde die Auswahl des eingesetzten Rattenstamms anhand der folgenden Überlegung getroffen. In den ursprünglichen Publikationen zur Isolation von proximalen Tubuluszellen kommen sowohl Fischer-344-, als auch *Sprague-Dawley*- (SD-) und Wistar-Ratten zum Einsatz (Boogaard *et al.*, 1989a; Jakoby, 1981; Jones *et al.*, 1979; Lash and Tokarz, 1989). Schaaf beschreibt, dass sich der Wistar-Stamm aufgrund anatomischer Gegebenheiten besonders zur Perfusion der Nieren eignet (Schaaf *et al.*, 2004). Da außerdem in einer vergleichenden Untersuchung von C. H. Winter gezeigt wurde, dass mit Wistar-Ratten eine höhere Ausbeute an Primärzellen erreicht werden kann als mit SD-Ratten, wurde für die Isolation auf diesen Rattenstamm zurückgegriffen (Winter, 2006). Um eventuelle Einflüsse des Ovarialzyklus auszuschließen wurden außerdem ausschließlich männliche Tiere verwendet.

Für die Isolation wurde auf eine *In-situ*-Perfusion der Nieren und anschließender Aufreinigung der proximalen Tubuluszellen zurückgegriffen (Schaaf *et al.*, 2004; Stanton *et al.*, 1986; Takenaka *et al.*, 1998). Die Perfusionsmethode geht ursprünglich auf Beschreibungen von Jones, Lash & Tokarz, Ormstad und Boogaard zurück (Boogaard *et al.*, 1989b; Jakoby, 1981; Jones *et al.*, 1979; Lash and Tokarz, 1989). Nach Dissoziation des Nierengewebes und einer anschließenden mechanischen Trennung des Kortex von der Medulla, erfolgt abschließend die Aufreinigung der Tubuluszellen. Der erste Schritt der Gewebedissoziation findet durch eine Perfusion mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator wie Ethylenglycol-bis(aminoethyl-ether)-N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) und einem oder mehreren proteolytischen Enzym(en) statt. Kritische Parameter sind dabei die Wahl und die Konzentration des Enzyms, die Durchflussrate sowie die Inkubationsdauer. Zur Isolation proximaler Tubuluszellen aus der Ratte wird häufig die am stärksten digestive Kollagenase vom Typ 2 verwendet. Zu hohe Enzymkonzentrationen beziehungsweise zu hohe Durchflussraten resultierten in einer unvollständigen Verdauung des Gewebes, was sich vor allem durch eine hohe Anzahl an Zellagglomerationen in der Cortex-Suspension bemerkbar machte. Die Ursache dafür liegt vermutlich in einer unvollständigen Enzymexposition des Gewebes (Jones *et al.*, 1979). In Pilotexperimenten wurden die besten Erfolge mit einer *In-situ*-Perfusion mit 0,13 % Kollagenase Typ 2 für 20 min bei einer Durchflussrate von 7,5 ml/min, wie von Schaaf *et al.* beschrieben, erzielt (Schaaf 2004). Daher wurden die Isolationen unter diesen Versuchsbedingungen durchgeführt.

Die Aufreinigung der proximalen Tubuluszellen aus der Nierenkortex-Zellsuspension kann mit Hilfe unterschiedlicher Methoden erfolgen. Klassischerweise findet eine Trennung anhand der Größe (durch Zellsiebe) und gegebenenfalls nach der Dichte (durch Gradientenzentrifugation mit Percoll) statt. Mit

Hilfe neuerer Methoden, wie etwa durch eine anschließende Aufreinigung mittels immunomagnetischer Separation oder mittels Durchflusszytometrie, lässt sich eine noch höhere Reinheit an proximalen Tubuluszellen erhalten (Baer *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2008; Van der Hauwaert *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 1985). So konnte etwa durch Brown *et al.* eine nahezu hundertprozentige Aufreinigung humaner proximaler Tubuluszellen durch Zellfluss-Sortierung nach Markierung mit dem proximalen Tubulusmarker Leucin-Amino-peptidase (LAP) erreicht werden (Brown *et al.*, 2008). Vergleichbare Ergebnisse wurden in einer neueren Arbeit von Van der Hauwaert *et al.* mit einer ähnlichen Methode durch Auftrennung über die proximalen Tubulus-Marker Atriopeptidase (CD10) und Alanin-Amino-peptidase (ANPEP, CD13) beschrieben (Van der Hauwaert *et al.*, 2013). Die Ausbeute an Zellen ist jedoch vergleichsweise gering und erlaubt nur ein begrenztes Versuchsvolumen. Darüber hinaus ist die Viabilität der auf diese Weise isolierten Zellen sehr gering (Qi *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde durch Brown *et al.* gezeigt, dass die in einer Mischfraktion aus proximalen und distalen Tubuluszellen enthaltenen distalen Tubuluszellen weitestgehend inaktiv in Bezug auf den Transport von PAH und Kreatinin sind, sowie kaum Arzneistofftransporter exprimieren (Brown *et al.*, 2008). Daher und auch in Hinblick auf den hohen experimentellen Aufwand wurde auf entsprechende zusätzliche Aufreinigungsschritte mittels Durchflusszytometrie verzichtet. Mit Hilfe der modifizierten Isolationsmethode durch Zellsiebe nach Schaaf *et al.* konnten erfolgreich Zellen mit einer Zellausbeute von  $22,85 \pm 8,15 \cdot 10^6$  Zellen pro Versuchstier isoliert werden. Für spezielle Fragestellungen, bei denen niedrige Zellausbeuten ausreichend sind und zugleich eine extrem hohe Reinheit der Zellen benötigt wird, würden sich die oben genannten Aufreinigungsschritte als Option anbieten.

### 3.2.2 Überlegungen zu den Kulturbedingungen

Ein kritischer Faktor in der Kultivierung von primären proximalen Tubuluszellen ist die Zusammensetzung des Kulturmediums (Courjault-Gautier, 1995; Taub *et al.*, 1989). Als Standard-Kulturmedium wird in den meisten Publikationen DMEM/F12 (1:1) beschrieben, bezüglich der Supplementierung mit Serum beziehungsweise mit speziellen Medienzusätzen gibt es jedoch unterschiedliche Angaben. Während in einigen Laboren auf den Zusatz von Serum zum Kulturmedium verzichtet wird, wird in anderen Beschreibungen eine Serumkonzentration von 1-10 % erwähnt (Chan *et al.*, 1996; de Graauw *et al.*, 2007; Haenen *et al.*, 1996; Imamdi, 2004; Luhe, 2003; Mitsuoka *et al.*, 2009; Schaaf *et al.*, 2001; Terlouw *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2009; van de Water *et al.*, 1999). Ursache für die kontroversen Angaben sind die variablen Zusammensetzungen der unterschiedlichen Serumchargen sowie der dedifferenzierende Einfluss von Serum bei Langzeitanwendung. Daher wurde gemäß den Empfehlungen von Schaaf *et al.* im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit zum Anheften der Zellen eine initiale Serumkonzentration von 10 % gewählt, und nach 24 h ein Wechsel zu serumfreiem Medium durchgeführt, um den dedifferenzierenden Einfluss des Serums zu verhindern. So wurde etwa von Van der Hauwaert *et al.* beschrieben, dass aufgereinigte humane proximale Tubuluszellen in serumfreiem Medium einen

Epithel-ähnlicheren Phänotyp entwickelten als in Medium das FCS enthielt (Van der Hauwaert *et al.*, 2013). Zu Verbesserung der Proliferation wurden dem Medium humanes Insulin, Transferrin und Selenium zugegeben. Da *in vivo* die renalen Zellen von einer Bindegewebshülle umgeben sind, die viele extrazelluläre Matrix-Komponenten wie Kollagen und Fibronectin enthält, wurden die Kulturschalen mit Rattenschwanz-Kollagen (Typ I) überschichtet. Diese Beschichtung verbessert laut Genestie *et al.*, die morphologischen und biochemischen Eigenschaften von primären Tubuluszellen (Genestie *et al.*, 1997). Zellen die im Rahmen dieser Arbeit in Kulturgefäßen ohne Kollagen-Beschichtung ausgesät wurden, zeigten eine schlechtere Adhärenz sowie ein verlangsamtes Wachstum. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit Beobachten von Gowder & MC Martin. Im Gegensatz dazu wurde von Van der Hauwaert *et al.* kein Wachstums-Unterschied bei humanen proximalen Tubuluszellen, die auf unbeschichteten oder mit Kollagen- beziehungsweise Matrigel®-beschichteten Oberflächen kultiviert wurden, beobachtet. Unter allen Wachstums-Bedingungen zeigten die Zellen die gleiche Morphologie und Ausprägung von *Tight Junctions* und Desmosomen (Van der Hauwaert *et al.*, 2013). Die Gründe dafür bleiben unklar, möglicherweise könnten Spezies-spezifische Faktoren oder auch Materialunterschiede in den Kultivierungsgefäßen eine Rolle spielen.

### 3.3 ZELLMORPHOLOGIE UND INTEGRITÄT DER ZELL-MONOLAYER

Primäre proximale Tubuluszellen bilden in Kultur normalerweise einschichtige *Monolayer* aus. Die Zellmorphologie entspricht dabei der eines typischen einschichtigen isoprismatischen Epithels mit einem Kopfsteinpflaster-artigen Zellmuster, wie es für epitheliale Barrieren typisch ist (Courjault-Gautier, 1995; Gowder and McMartin, 2010; Van der Hauwaert *et al.*, 2013; Lash and Tokarz, 1989; Qi *et al.*, 2007; Schaaf *et al.*, 2001; Sikka and McMartin, 1996). Die mit der gewählten Isolationsmethode gewonnenen Primärzellen aus der Ratte und aus dem Affen zeigten nach Kultivierung vergleichbare zellmorphologische Merkmale.

Aber nicht nur die primären Tubuluszellen sondern auch die untersuchten renalen Zelllinien entwickelten einschichtige, konfluente *Monolayer* mit typischer kubischer Zellmorphologie. Eine Ausnahme waren die Zellen der Caki-1-Zelllinie. Statt der typischen kubischen Zellform entwickelte sich eine langgestreckte, Fibroblasten-artige Morphologie, ohne dass sich ein konfluenter *Monolayer* ausbildete. Die gleiche Beobachtung wurde in einer Arbeit von Charlton *et al.* beschrieben (Charlton and Simmons, 1993). Im Gegensatz dazu wurde durch Glube *et al.* beschrieben, dass die Caki-1-Zelllinie nach acht Tagen einen dichten *Monolayer* mit polygonförmigen Zellen ausbildet (Glube *et al.*, 2007a). Möglicherweise sind diese konträren Beobachtungen durch Unterschiede in den Kulturbedingungen, wie unterschiedliche Kulturdauer, unterschiedlicher Zellpassagen (Passagen 29–41 bei Glube *et al.* beziehungsweise Passagen 31–62 in dieser Arbeit) oder auch Verwendung eines anderen Zellsubtyps zu

erklären. Tatsächlich stammen die Zellen von Glube *et al.* von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), während die in dieser Arbeit verwendeten Zellen von der *American type culture collection* (ATCC) bezogen wurden.

### 3.4 EXPRESSION VON PROXIMALEN UND DISTALEN TUBULUSMARKERN

Wie die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung gezeigt haben, konnte erfolgreich eine Methode zur Isolierung von primären Tubuluszellen der Ratte etabliert werden. Nach 5-tägiger Kultivierung bildeten die Zellen einen dichten *Monolayer* mit einer für proximale Tubuli typischen Morphologie aus. Zu weiteren Charakterisierung und zur Bestätigung des proximalen Ursprungs wurden sowohl frisch isolierte primäre Tubuluszellen als auch 5 Tage kultivierte primäre Tubuluszellen eingesetzt und mit verschiedenen Nierenzelllinien verglichen. Die Charakterisierung erfolgte auf mRNA- und Proteinebene mittels qPCR, *Western Blot* und immunohistochemischer Methoden. Die vergleichende Analyse von frisch isolierten und kultivierten Primärzellen sollte Aufschluss darüber geben, ob oder beziehungsweise inwieweit eine Dedifferenzierung der Zellen unter Kulturbedingungen stattfindet, da bekannt ist, dass sich die Charakteristika isolierter Primärzellen unter Kulturbedingungen verändern können. Des Weiteren wurden auch die immortalisierten Zelllinien charakterisiert um festzustellen, ob ein für proximale Tubuli charakteristischer Geno- beziehungsweise Phänotyp vorliegt.

Die proximalen Tubuli stellen innerhalb der Nephronen einen klar abgegrenzten Abschnitt mit eigenständigen morphologischen und physiologischen Merkmalen und spezifischen Aufgaben dar. Von den anderen Nephronsegmenten, wie etwa den distalen Tubuli oder dem Sammelrohr, unterscheiden sie sich unter anderem durch ihre Permeabilität und Transporteigenschaften sowie durch einen unterschiedlichen Energiestoffwechsel. Aufgrund dessen weisen die einzelnen Tubulussegmente charakteristische Expressionsmuster verschiedener Strukturproteine, Ionenkanäle und Transportproteine, Rezeptoren und Enzyme auf. Diese differentielle Genexpression in den Nephronen wird häufig zur Unterscheidung der einzelnen Segmente verwendet (Courjault-Gautier, 1995; Prozialeck *et al.*, 2004). In der Literatur herrscht allerdings keine Einigkeit darüber, welches die zuverlässigsten Marker sind. So wird in unterschiedlichen Publikationen die Expression einer ganzen Reihe unterschiedlicher Gene beziehungsweise Proteine zur Unterscheidung von proximalen Tubuli von anderen Tubulussegmenten, wie etwa den distalen Tubuli, herangezogen. Eine Übersicht gibt Tabelle 3-2. Zudem sind die in der Literatur vorhandenen Informationen weit verstreut und die entsprechenden Untersuchungen zur Expression der Differenzierungsmarker beziehen sich auf verschiedene Zellsysteme aus unterschiedlichen Spezies. Eine vergleichende Untersuchung der primäreren Nierenzellen aus der Ratte mit diversen renalen Zelllinien, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, ist daher von Interesse. Dabei galt es zu berücksichtigen, dass die Untersuchung des Expressionsmusters eines einzelnen Markers kein hinreichendes Kriterium für die Charakterisierung renaler Zellen hinsichtlich ihrer Herkunft

aus proximalen oder anderen Tubulussegmenten darstellt. Hinweise darauf finden sich beispielsweise bei Van der Hauwaert *et al.* (Van der Hauwaert *et al.*, 2013). Weiterhin wurde durch die Literaturrecherche deutlich, dass einige der klassischerweise eingesetzten Marker weniger spezifisch für proximale Tubuli zu sein scheinen. So konnte etwa gezeigt werden, dass die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (*ATP1A1*) in vergleichbarer Stärke sowohl in proximalen als auch in distalen humanen Tubuluszellen exprimiert wird (Baer *et al.*, 2006). Bei der Auswahl der zu evaluierenden Differenzierungsmarker wurde daher darauf geachtet, dass keine kontroversen Daten in der Literatur zu finden waren. Da innerhalb des Nephrons lediglich in den proximalen Tubuli (insbesondere in den S1-Segmenten) ein ausgeprägter Bürstensaum mit zahlreichen Mikrovilli vorkommt, wurden die typischen Bürstensaumepithel-Marker alkaline Phosphatase, Alanin-Aminopeptidase und Villin 1 als Marker eingesetzt. Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal der proximalen Tubuli innerhalb des Nephrons ist deren hohe Glukoneogenese-Aktivität. Die Zellen des distalen Tubulusbereichs betreiben hingegen hauptsächlich Glykolyse (Courjault-Gautier, 1995; Toutain *et al.*, 1990). Es bot sich daher an, jeweils ein typisches Enzym der beiden Glukose-Stoffwechselwege als Marker für die beiden Tubuliabschnitte zu nutzen. Zu diesem Zweck wurde das Paar aus  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 (Glukoneogenese) und Hexokinase 1 (Glykolyse) gewählt.

#### 3.4.1 Expression der Markergene in frisch isolierten primären Nierenzellen

Aus den Ergebnissen der durchgeführten Expressionsanalysen geht hervor, dass die frisch isolierten Nierenzellen alle untersuchten proximalen Tubulusmarker auf mRNA-Ebene exprimierten. Die Expression konnte für Villin 1 zusätzlich auf Protein-Ebene und für  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 auch auf funktioneller Ebene bestätigt werden. Im Gegensatz zu den Zelllinien war das Villin 1-Signal im *Western Blot* bereits ohne Aufreinigung der Membranfraktion im Gesamtlysat detektierbar, was auf die deutlich höhere Expression hinweist. Der distale Glykolyse-Marker Hexokinase 1 konnte in den Zellen nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse bestätigten die erfolgreiche Isolierung der proximalen Tubuluszellen aus der Ratte, wie es bereits anhand der Morphologie der Zellen vermutet worden ist. Gleiches gilt für die aus dem Affen isolierten Zellen. Der Nachweis erfolgte hier aufgrund der geringen Probenmenge jedoch nur auf funktioneller Ebene über die  $\gamma$ -Glutamyltransferase-1-Aktivität.

#### 3.4.2 Expression der Markergene in den Nierenzelllinien

Bei den untersuchten renalen Zelllinien zeigte sich dagegen ein anderes Bild. Trotz des positiven Nachweises einzelner Marker zeigten sich deutliche Unterschiede im Expressionsmuster zu den frisch isolierten primären Tubuluszellen, was auf eine deutlich stärkere Dedifferenzierung hinweist. Allerdings sind die Expressionsdaten aufgrund des Speziesunterschieds zwischen Ratte und Mensch unter Umständen nur bedingt aussagekräftig. Aus mehreren Publikationen geht jedoch hervor, dass alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Marker auch in humanen proximalen Tubuluszellen exprimiert werden (siehe Tabelle 3-2).

Bei Betrachtung des mRNA-Expressionsmusters der proximalen Tubulusmarker von NRK-52E-Zellen fällt die geringe Expression der proximalen Tubulusmarker alkaline Phosphatase, Alanin-Aminopeptidase, Villin 1 und  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 auf. Insbesondere die beiden Bürstensaum-Markerproteine Villin 1 und alkaline Phosphatase wurden nur in sehr geringem Maße auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen. Ähnliche Beobachtungen, in Form niedriger  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1- und alkaliner Phosphatase-Aktivitätsniveaus wurden von Lash *et al.* gemacht (Lash *et al.*, 2002). Andererseits zeigten die Zellen ein äußerst niedriges HK1-Expressionsniveau, ein Hinweis auf eine geringe Glykolyse-Aktivität, wie es auch bei den frisch isolierten proximalen Tubuluszellen der Fall war. Allerdings ist die beobachtete niedrige Glukoneogenese-Aktivität (niedriges mRNA-Expressionsniveau und geringe Aktivität der  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1) wiederum ein Hinweis darauf, dass kein für proximale Tubuluszellen typischer Phänotyp vorliegt. Gestützt wird dies auch durch die ebenfalls von Lash *et al.* beschriebene hohe Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH), eines typischen Enzyms der distalen Tubuluszellen (Courjault-Gautier, 1995). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die NRK-52E-Zellen im direkten Vergleich mit den frisch isolierten proximalen Tubuluszellen deutlich in einem Status der Dedifferenzierung befinden.

Für die beiden humanen Zelllinien IHKE-1- und Caki-1 konnte ein sich ähnelndes Expressionsmuster beobachtet werden. Beide zeigten im Vergleich zu den frisch isolierten proximalen Tubuluszellen eine geringe Expression, beziehungsweise Aktivität der proximalen Tubulusmarkerproteine bei gleichzeitiger Expression von Hexokinase 1, was dem typischen Bild von distalen Tubuluszellen entspricht. Es wurde zwar in beiden Zelllinien Alanin-Aminopeptidase-mRNA, sowie die Aktivität der  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 nachgewiesen, das Expressions- beziehungsweise Aktivitätsniveau war allerdings mindestens um den Faktor zehn geringer als in frisch isolierten proximalen Tubuluszellen. Es kann daher vermutet werden, dass sich auch diese beiden renalen Zelllinien, wie auch schon die NRK-52E-Zellen, in einem Dedifferenzierungsstatus befinden und daher nicht die typischen Eigenschaften proximaler Tubuli widerspiegeln. Weiterhin lässt dies die Vermutung zu, dass der alleinige Nachweis von Alanin-Aminopeptidase (auf mRNA-Ebene) beziehungsweise  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 (auf funktioneller Ebene) kein ausreichendes Kriterium zur Charakterisierung der Zellen darstellt. Entscheidend ist vielmehr die Höhe der Expression beziehungsweise der Aktivität in Relation zu den proximalen Tubuluszellen.

In der humanen Caki-1-Zelllinie konnte, wie auch Glube *et al.* zeigen konnten, Alanin-Aminopeptidase und  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 in den Zellen nachgewiesen werden (Glube *et al.*, 2007a). Zusätzlich gelang Glube *et al.* allerdings auch der Nachweis von ALPL, welches in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte, sowie der im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchten proximalen Tubulusmarker Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) und NHE3 (SLC9A3). Die (teilweise) Diskrepanz in Bezug auf die ALPL-

Expression könnte mit Zell-*Batch*-Variationen erklärt werden (siehe auch Kapitel 3.3). Es gibt allerdings Hinweise, dass die Caki-1-Zellen eher dem distalen Tubulus entsprechen, da in der genannten Veröffentlichung von Glube *et al.* auch die Expression von E-Cadherin, auch bekannt als Cadherin-1 (CDH1), in den Zellen beschrieben wurde. E-Cadherin wurde sowohl im distalen Tubulus des Menschen als auch von der Ratte nachgewiesen und wird daher häufig als Marker für distale Tubuli verwendet (Baer *et al.*, 2006; Van der Hauwaert *et al.*, 2013; Nouwen *et al.*, 1993; Prozialeck *et al.*, 2004).

### 3.4.3 Expression der Markergene in kultivierten primären Nierenzellen

Anhand der Untersuchung des Expressionsmusters der proximalen und distalen Tubulusmarker in den frisch isolierten Nierenzellen konnte gezeigt werden, dass die Expressionsmuster mit denen in der Literatur für proximale Tubuli *in vivo* beschriebenen vergleichbar sind. Damit ist der Beweis erbracht worden, dass es sich bei den isolierten primären Nierenzellen auch tatsächlich um proximale Tubuluszellen handelt. Das typische Expressionsmuster der Tubulusmarker änderte sich jedoch nach 5 Tagen in Kultur. Die Expression aller untersuchten proximalen Tubulusmarker verringerte sich sowohl bei Ratten- als auch bei Affenzellen um ca. 96-99 %. Die verringerte Expression beziehungsweise Aktivität von alkaliner Phosphatase, Alanin-Aminopeptidase und Villin 1 ist ein Hinweis darauf, dass der Bürstensaum in den Zellen nicht erhalten geblieben ist. Dies könnte auf eine Dedifferenzierung zu einem mehr distalen Tubulus-ähnlichen Phänotyp hinweisen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Verringerung der Abnahme der  $\gamma$ -Glutamyltransferase-1-Expression bei gleichzeitiger *De-novo*-Expression von Hexokinase 1, ein Hinweis auf einen möglichen Wechsel von glukoneogenetischer (typisch proximaler) zu glykolytischer (typisch distaler) Aktivität. Allerdings könnte eine Umstellung des Glukose-Metabolismus auch auf eine Adaption an die Kulturbedingungen, beziehungsweise an die Proliferation, und nicht auf eine Dedifferenzierung zurückgeführt werden (Toutain *et al.*, 1990).

Tabelle 3-2: Literaturübersicht über Differenzierungsmarker für proximale und distale Tubuli

Region	Name (Entrez)	Gen (Entrez)	Synonym	Referenz
PT	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	<b>ALPL</b>		Baer <i>et al.</i> , 2006; Chan <i>et al.</i> , 1996; Evans, 1994; Courjault-Gautier, 1995; Glube <i>et al.</i> , 2007b; Guder and Ross, 1984; Lash and Tokarz, 1989; Lash, 2001; Qi <i>et al.</i> , 2007; Rahmoune <i>et al.</i> , 2005; Sikka and McMartin, 1996; Terryn <i>et al.</i> , 2007; Toutain <i>et al.</i> , 1990; Van der Hauwaert <i>et al.</i> , 2013
PT	Alanyl (membrane) aminopeptidase	<b>ANPEP</b>	Aminopeptidase N, CD13	Courjault-Gautier, 1995; Gildea <i>et al.</i> , 2010; Glube <i>et al.</i> , 2007b; Rahmoune <i>et al.</i> , 2005; Schwarz <i>et al.</i> , 2002; Toutain <i>et al.</i> , 1990; Van der Hauwaert <i>et al.</i> , 2013; Wilmer <i>et al.</i> , 2005
PT	Aquaporin 1	<b>AQP1</b>		Baer <i>et al.</i> , 2006; Van der Hauwaert <i>et al.</i> , 2013
PT	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 1 polypeptide	<b>ATP1A1</b>	Na+/K+-ATPase	Boom and Russel, 1993; Boom <i>et al.</i> , 1992; Courjault-Gautier, 1995; Glube <i>et al.</i> , 2007b
PT	Cadherin 2, type 1	<b>CDH2</b>	N-Cadherin	Luhe, 2003; Prozialeck <i>et al.</i> , 2004; Van der Hauwaert <i>et al.</i> , 2013; Weiland <i>et al.</i> , 2007
PT	Dipeptidylpeptidase 4	<b>DPP4</b>	CD26	Glube <i>et al.</i> , 2007b
PT	Glutamyl aminopeptidase	<b>ENPEP</b>	CD249	Gildea <i>et al.</i> , 2010
PT	Fructose-1,6-bisphosphatase 1/2	<b>FBP1/2</b>		Courjault-Gautier, 1995
PT	Gamma glutamyltransferase 1	<b>GGT1</b>		Boogaard <i>et al.</i> , 1990; Chan <i>et al.</i> , 1996; Dietrich <i>et al.</i> , 2001; Evans, 1994; Courjault-Gautier, 1995; Gildea <i>et al.</i> , 2010; Glube <i>et al.</i> , 2007b; Lash and Tokarz, 1989; Lash, 2001; Price <i>et al.</i> , 2009; Qi <i>et al.</i> , 2007; Sikka and McMartin, 1996; Toutain <i>et al.</i> , 1990; Weiland <i>et al.</i> , 2007
PT	Intercellular adhesion molecule 1	<b>ICAM1</b>	CD54	Baer <i>et al.</i> , 2006
PT	Leucine aminopeptidase 3	<b>LAP3</b>		Brown <i>et al.</i> , 2008
PT	Low density lipoprotein-related protein 2	<b>LRP2</b>	Megalyn	Gildea <i>et al.</i> , 2010; Wilmer <i>et al.</i> , 2005
PT	Membrane metallo-endopeptidase	<b>MIME</b>	CD10	Baer <i>et al.</i> , 2006; Helbert <i>et al.</i> , 1999; Van der Hauwaert <i>et al.</i> , 2013

PT	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	<b>PCK1</b>	PEPCK	Courjault-Gautier, 1995
PT	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3	<b>SLC9A3</b>	NHE3	Glube <i>et al.</i> , 2007b; Luhe, 2003
PT	Villin 1	<b>VIL1</b>		Gildea <i>et al.</i> , 2010; Kemmer, 2005
PT	Vimentin	<b>VIM</b>		Sikka and McMartin, 1996
PT (S1)	Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 2	<b>SLC5A2</b>	SGLT2	Rahmoune <i>et al.</i> , 2005; Van der Hauwaert <i>et al.</i> , 2013
PT (S2)	Carbonic anhydrase IV	<b>CA4</b>		Van der Hauwaert <i>et al.</i> , 2013
PT (S3)	Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1	<b>SLC5A1</b>	SGLT1	Van der Hauwaert <i>et al.</i> , 2013
DT	Cadherin 1, type 1	<b>CDH1</b>	E-Cadherin	Baer <i>et al.</i> , 2006; Nouwen <i>et al.</i> , 1993; Prozialeck <i>et al.</i> , 2004; Van der Hauwaert <i>et al.</i> , 2013
DT	Hexokinase 1	<b>HK1</b>		Courjault-Gautier, 1995; Lash and Tokarz, 1989; Toutain <i>et al.</i> , 1990
DT	Lactate dehydrogenase A/B/C	<b>LDHA/B/C</b>		Courjault-Gautier, 1995
DT	Mucin 1, cell surface associated	<b>MUC1</b>		Van der Hauwaert <i>et al.</i> , 2013
DT	Solute carrier family 12 (sodium/chloride transporters), member 3	<b>SLC12A3</b>	NCC	Gildea <i>et al.</i> , 2010

PT: Proximaler Tubulus, DT: Distaler Tubulus

### 3.5 BARRIEREEIGENSCHAFTEN DER UNTERSUCHTEN ZELLMODELLE

Zusätzlich zur molekularbiologischen Charakterisierung der primären Tubuluszellen und der renalen Zelllinien in Hinblick auf die Expression von Marker-Genen, wurden die Zellmodelle auch hinsichtlich ihrer Barriereigenschaften evaluiert. Eine wesentliche Komponente bei der Determination der Barriereigenschaften eines Epithels sind die *Tight Junctions*. Diese bestimmen die parazelluläre Permeabilität für gelöste Substanzen, Ionen und Makromoleküle sowie über die Polarisierung der Epithelzellen (Anderson and Van Itallie, 2009; Brown and Stow, 1996; Fanning *et al.*, 1999; Lutz and Siahaan, 1997; Prozialeck *et al.*, 2006). Bei der Beurteilung eines *In-vitro*-Modells der proximalen Tubuli ist daher der funktionelle Status der *Tight Junctions* ein wichtiger Aspekt.

Vor einigen Jahren sind zwei wichtige Proteine beziehungsweise Proteinfamilien identifiziert worden, die an der Bildung der apikalen intramembranösen Fibrillen maßgeblich beteiligt sind: Occludin und die Familie der Claudine. Occludin ist das erste identifizierte *Tight-Junction*-Protein. Es wird in allen Epithel- und Endothelzellen, sowie darüber hinaus auch in Neuronen und Astrozyten exprimiert (Balda and Matter, 2000; Bauer *et al.*, 1999; Hirase *et al.*, 1997, 1997). Gemeinsam mit dem *Tight Junction Protein 1* (TJP1/ZO-1) verbindet es die *Tight Junctions* mit dem Cytoskelett der Zelle (Prozialeck *et al.*, 2006; Colegio *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 1999; Turksen and Troy, 2004). Die Claudine sind eine Gruppe von etwa 20 Transmembran-Proteinen, die zur PMP22/EMP/MP20/Claudin-Superfamilie (pfam00822) gehören (Anderson and Van Itallie, 2009). Im Gegensatz zu Occludin werden Claudine nur in einer begrenzten Anzahl spezifischer Gewebetypen exprimiert und sind mit Gewebe-spezifischen Funktionen der *Tight Junctions* assoziiert (Balda and Matter, 2000). Man weiß mittlerweile, dass neben der Anzahl und der Komplexität der intramembranösen Fibrillen vor allem die Claudine für die Dichtigkeit eines Epithels verantwortlich sind. Genauer gesagt entscheidet die Kombination unterschiedlicher Claudine und deren Verhältnis zueinander über die Durchlässigkeit der *Tight Junctions* für gelöste Moleküle (Anderson and Van Itallie, 2009; Furuse *et al.*, 2001; Kiuchi-Saishin *et al.*, 2002; Prozialeck *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2002; Schneeberger and Lynch, 2004; Turksen and Troy, 2004). In den *Tight Junctions* der proximalen Tubuli muss durch die richtige Kombination von Claudinen beispielsweise die physiologische Funktion der passiven parazellulären Reabsorption von Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionen gewährleistet sein (Enck *et al.*, 2001).

Es ist bekannt, dass in den unterschiedlichen Nephron-Segmenten mindestens 11 verschiedene Claudine exprimiert werden, darunter die Claudine -1, -2, -3, -4, -7, -8, -10, -11, -14, -15 und -16 (Alexandre *et al.*, 2005; Kiuchi-Saishin *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2002). Kiuchi-Saishin *et al.* haben bereits 2002 eine Studie publiziert, in der die differentiellen Expressionsmuster der Claudine-1 bis -16 in den Nephronen der Maus untersucht wurden (Kiuchi-Saishin *et al.*, 2002). Er konnte zeigen, dass die Claudin-Expression in den Nephronen Segment-spezifisch ist und die Zellen des proximalen Tubulus

ein charakteristisches Expressionsmuster aufweisen. In anderen Studien wurde außerdem gezeigt, dass auch weitere Adhäsions- und Gerüstproteine der apikalen Verbindungskomplexe sich in ihrer Expression entlang des Nephrons deutlich unterscheiden (Jiang *et al.*, 2004; Nouwen *et al.*, 1993; Prozialeck *et al.*, 2004). Ein Beispiel hierfür sind die Cadherine, die bei der Zell-Zell-Adhäsion durch die *Adherens Junctions* beteiligt sind. Entsprechend werden N-Cadherin (CDH2) und E-Cadherin (CDH1) auch als Marker für proximale beziehungsweise distale Tubuli verwendet (siehe Kapitel 3.4). Die differentielle Claudin-Expression wurde später auch in Nephronen des Kaninchens und des Menschen bestätigt (Kemmer, 2005; Reyes *et al.*, 2002). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass auch in der Ratte die Claudine Segment-spezifisch lokalisiert sind. Entsprechende Untersuchungen konnten in der Literatur allerdings nicht gefunden werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die Expression der *Tight-Junction*-Proteine in den proximalen Tubuluszellen der Ratte untersucht.

### 3.5.1 Barriereeigenschaften der frisch isolierten primären Nierenzellen

Die mRNA-Analysen ergaben, dass in den frisch isolierten proximalen Tubuluszellen Occludin und TJP1, sowie Claudin-7 und Claudin-10 exprimiert werden. Beide Claudine sind zuvor im Kaninchen, beziehungsweise in der Maus als spezifisch für die proximalen Tubuli beschrieben worden (Prozialeck *et al.*, 2006; Reyes *et al.*, 2002; Kiuchi-Saishin *et al.*, 2002). Die Expression von Claudin-7 und Claudin-10 in den frisch isolierten Primärzellen kann daher, zusätzlich zu der im vorigen Kapitel beschriebenen Differenzierungsmarker-Expression, als ein weiterer Hinweis auf die Identität der Zellen betrachtet werden.

Interessanterweise konnte die mRNA von Claudin-2, welches nachweislich in den proximalen Tubuli lokalisiert ist (Kemmer, 2005; Kiuchi-Saishin *et al.*, 2002; Reyes *et al.*, 2002), nur in minimalen Mengen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in den unterschiedlichen untersuchten Spezies liegen. In der Literatur gibt es mehrfach Hinweise darauf, dass sich die Claudin-Expressionsmuster in den Nephronen zwischen verschiedenen Spezies unterscheiden können. Beispielsweise wurde Claudin-3 in Studien von Kiuchi-Saishin *et al.* mit proximalen Tubuli aus der Maus nicht gefunden. Bei einer späteren Analyse der proximalen Tubuli im Menschen konnte hingegen Claudin-3 nachgewiesen werden. Ebenso verhält es sich mit Claudin-11, das zwar in den proximalen Tubuli der Maus, nicht aber in denen des Menschen nachgewiesen werden konnte (Kemmer, 2005; Kiuchi-Saishin *et al.*, 2002). Daher besteht die Möglichkeit, dass das Fehlen von Claudin-2 in den Nephronen der Ratte eine Spezies-spezifische Anpassung darstellt.

### 3.5.2 Barriereeigenschaften der kultivierten primären Nierenzellen

Wie schon aus den Analysen der Tubulusmarker-Expression hervorgegangen ist, veränderten die primären proximalen Tubuluszellen im Laufe der Kultivierung ihr Expressionsverhalten. Die Expression von fast allen Marker-Proteinen ging deutlich zurück. Ein ähnliches Verhalten zeigte sich auch bei der

Analyse der untersuchten *Tight-Junction*-Proteine Claudin-2 und Claudin-10. Im Gegensatz dazu blieb die Expressionsstärke von TJP1 unverändert beziehungsweise erhöhte sich sogar im Falle von Claudin-7. Dies konnte auch durch Immunfluoreszenz-Analysen bestätigt werden.

Zu den Immunfluoreszenz-Färbungen sollen an dieser Stelle einige Anmerkungen zu den verwendeten Antikörpern gegeben werden. Da die Expression in Zellen aus drei verschiedenen Spezies (Hund, Ratte und Mensch) untersucht wurde, besteht die Gefahr falsch-negativer Befunde aufgrund fehlender Spezifität der primären Antikörper für eine (oder mehrere) der Spezies. Für die gegen Occludin, TJP1 und Claudin-7 gerichteten Antikörper kann dies ausgeschlossen werden, da mindestens ein positiver Nachweis pro Spezies erfolgt ist. Im Fall von Claudin-2 erfolgte ein Nachweis in MDCKII-Zellen. Da die Kreuzreaktivität mit der Ratte und dem Mensch zuvor vom Hersteller des Antikörpers nachgewiesen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass das Ausbleiben eines Signals in den restlichen Zellen tatsächlich auf die fehlende Expression von Claudin-2 zurückgeführt werden kann. Lediglich für Claudin-10 konnte in keiner der Zellen ein eindeutiges Signal detektiert und daher kein direkter Nachweis der Reaktivität des Antikörpers geführt werden. Es wurde jedoch durch den Hersteller die Spezifität des Antikörpers für humanes Claudin-10 demonstriert. Zudem war eine Expression auf Protein-Ebene aufgrund der minimalen mRNA-Mengen in NRK-52E-, Caki-1 und kultivierten Primärzellen unwahrscheinlich. Für die MDCKII-Zelllinie ist in anderer Stelle beschrieben, dass diese kein Claudin-10 exprimieren (Hou *et al.*, 2006).

Während die Menge an TJP1-mRNA nach 5 Tagen Kultur nur leicht verringert war, zeigte sich bei den anderen untersuchten *Tight-Junction*-Proteinen eine stärkere Veränderung. Für Claudin-2 wurde zwar eine Reduzierung um 52 % beobachtet, allerdings war die Ausgangsmenge an Claudin-2-mRNA bereits äußerst gering, weshalb es fraglich ist, ob diese (absolut sehr geringe) Reduzierung für die Proteinexpression von Claudin-2 von Relevanz ist. In Bezug auf die beiden Claudine -7 und -10 war interessanterweise eine uneinheitliche Entwicklung zu beobachten. So war eine Zunahme an Claudin-7 von einer Verringerung der Claudin-10-Expression begleitet. Dieses Ergebnis bestätigt die anfängliche Vermutung, dass primäre proximale Tubuluszellen während der Kultivierung dedifferenzieren. Des Weiteren lässt sich auch daraus schlussfolgern, dass die Zellen nicht, wie zuvor aufgrund des Anstiegs des distalen Tubulusmarkers HK1 angedeutet, zu einem distalen Phänotyp differenzieren. Da beide Claudine als proximale Tubulusmarker beschrieben sind, wäre zu erwarten, dass sich die Expression beider Claudine verringert. Dies war aber nicht der Fall. Weiterhin berichten Li *et al.*, im Gegensatz zu den oben genannten Publikationen, in denen die Expression von Claudin-7 als auf die proximalen Tubuli beschränkt beschrieben wurde, dass Claudin-7 in der Maus auch in distalen Tubuli exprimiert wird (Li *et al.*, 2004). Dies spricht wiederum für die Annahme, dass die kultivierten Primärzellen eher distale Eigenschaften aufweisen. Aufgrund der kontroversen Literaturdaten und den diskutierten möglichen

Speziesunterschieden kann die Frage daher an dieser Stelle nicht geklärt werden und es bleibt zu hoffen, dass zukünftige Studien Gewissheit schaffen.

In guter Übereinstimmung mit dem beobachteten mRNA-Expressionsmuster der kultivierten Zellen wurde auch bei den Immunfluoreszenz-Färbungen als einziges der Claudine das Claudin-7 detektiert. Dabei war eine deutliche Ko-Lokalisierung von Claudin-7 mit TJP1 und Occludin an den Zell-Zell-Kontakten zu erkennen, was als ein Hinweis auf die Ausprägung funktionsfähiger *Tight Junctions* gewertet werden kann. Tatsächlich wurden für die kultivierten Primärzellen die höchsten TEER-Werte aller untersuchten Zellen gemessen. Zudem war die parazelluläre Permeation von Mannitol im Vergleich zu den immortalisierten Zelllinien NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1 gering.

Wie korreliert nun diese Dichtigkeit der Zellen mit der Expression von Claudin-7? In einer Veröffentlichung von Alexander *et al.* wurde gezeigt, dass durch die Transfektion von Claudin-7 in LLC-PK1-Zellen der parazelluläre Transport von Cl<sup>-</sup>-Ionen sowie die TEER-Werte der Zell-Monolayer deutlich erhöht wurden (Alexandre *et al.*, 2005). Daher wird angenommen, dass durch die Inkorporation von Claudin-7 in die *Tight Junctions* deren Dichtigkeit erhöht wird. Analog dazu wurde zuvor durch Furuse *et al.* anhand des MDCKI/MDCKII-Zellmodells nachgewiesen, dass Claudin-2 die Durchlässigkeit der *Tight Junctions* für Ionen verringert (Furuse *et al.*, 2001). Die Expression von Claudin-7 (zusammen mit dem Fehlen von Claudin-2) wäre also eine vorstellbare Erklärung für die vergleichsweise hohen TEER-Werte in den kultivierten Primärzellen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die isolierten primären Tubuluszellen aus der Ratte nach 5 Tagen in Kultur einen dichten *Monolayer* mit hohen transepithelialen Widerständen ausbilden. Das Expressionsprofil und die Lokalisierung der *Tight-Junction*-Proteine stehen mit dieser Beobachtung in Einklang. Im Wesentlichen trifft dies auch auf die aus dem Affen isolierten Primärzellen zu. Dort wurde zwar für Claudin-2 in den Immunfluoreszenz-Aufnahmen ein Signal detektiert, dieses ist jedoch diffus im Cytoplasma verteilt und nicht an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert, weshalb es für die Dichtigkeit der *Tight Junctions* zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Rolle spielt. Es könnte sich bei dem Signal sowohl um eine unspezifische Antikörperreaktion als auch um cytosolisch lokalisiertes Claudin-2, etwa als Reserve-Pool, handeln.

In Ergänzung zu den isolierten proximalen Tubuluszellen erschien es auch von Interesse, die Barriere-eigenschaften kommerziell erhältlicher humaner Primärzellen zu untersuchen. Interessanterweise glich das Expressionsmuster in den *Renal proximal tubule epithelial cells* (RPTEC) dem, welches in den primären proximalen Tubuluszellen aus Ratte und Affe beobachtet wurde. Auch in den RPTECs wurden sowohl Occludin und TJP1, als auch Claudin-7 als einziges Claudin an den Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen. Die Signale für Claudin-2 und Claudin-10 waren hingegen diffus und auf den cytoplasmatischen

Bereich der Zellen beschränkt und das Protein daher nicht in die intramembranösen Stränge der *Tight Junctions* integriert. Somit fehlten diesen Zelllinien mindestens die proximalen Tubuli-typischen Claudine -2 und -10. Im Unterschied zu den primären proximalen Tubuluszellen aus der Ratte und dem Affen war insbesondere die Expression von Claudin-7 sehr heterogen lokalisiert und beschränkte sich auf einige inselartige Bereiche des *Monolayers* während in benachbarten Zellarealen kein Signal detektiert werden konnte. Teilweise, wenn auch nicht in gleichem Maße, war darüber hinaus auch die Expression von Occludin und TJP1 unregelmäßig verteilt. Aufgrund dieser untypischen Eigenschaften erscheinen die Zellen als Modell der Barriereigenschaften der proximalen Tubuli wenig geeignet. Daher, und in Anbetracht des erheblichen Kostenaufwands, der mit der Kultivierung der RPTECs verbunden ist, wurden die Zellen in dieser Arbeit nicht eingehender charakterisiert.

### 3.5.3 Barriereigenschaften der Nierenzelllinien

Es stellte sich auch die Frage nach dem Expressionsverhalten der *Tight-Junction*-Proteine in den untersuchten Nierenzelllinien. Da die MDCKII-Zelllinie hinsichtlich der Expression von *Tight-Junction*-Proteinen bereits eingehend charakterisiert wurde, ist sie im Rahmen dieser Arbeit als Referenz-Zelllinie verwendet worden. Wie schon zuvor in der Literatur beschrieben, konnte in MDCKII-Zellen eine deutliche Expression von Claudin-2 und Claudin-7 nachgewiesen werden (Hou *et al.*, 2006; Furuse *et al.*, 2001). In beiden Fällen war die Immunfärbung deutlich an den Zell-Zell-Kontakten zu erkennen. Die MDCKII-Zellen waren die einzigen der untersuchten Zellen, in denen Claudin-2 und Claudin-7 koexprimiert wurden. Ebenfalls konsistent mit Literaturdaten war der negative Nachweis von Claudin-10 (Hou *et al.*, 2006). Da MDCKII-Zellen ihren Ursprung im Hund haben, war ein direkter Vergleich der Expressionsmuster mit denen der proximalen Tubuli aus dem Hund nicht möglich, da diese bisher nicht in Hinblick auf die Expression von *Tight-Junction*-Proteinen untersucht wurden.

Mit einem Wert von etwa  $180 \Omega \times \text{cm}^2$  entwickelten die MDCKII-Zellen den höchsten TEER-Wert der untersuchten immortalisierten Zelllinien. Lediglich für die Primärzellen aus der Ratte und aus dem Affen wurden noch höhere Werte gemessen. Der gemessene Wert entspricht in etwa dem in der Literatur für diese Zelllinie genannten Werten im Bereich von  $200 \Omega \times \text{cm}^2$  (Quan *et al.*, 2012; Furuse *et al.*, 2001). Da in den MDCKII-Zellen (im Gegensatz zu den Primärzellen) zusätzlich zu Claudin-7 auch Claudin-2 exprimiert wird, bestand die Vermutung, dass die *Monolayer* der Zellen eine geringere Permeabilität für Ionen aufweisen als die ausschließlich Claudin-7-exprimierenden Primärzellen. Diese Vermutung konnte durch die geringeren TEER-Werte der MDCKII-Zellen bestätigt werden.

In den Zelllinien NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1 wurde in den Immunfluoreszenz-Färbungen keines der untersuchten Claudine an den Zell-Zell-Kontakten detektiert. Für Claudin-2 war in IHKE-1- und Caki-1-Zellen ein diffuses Signal erkennbar. Da aber keine Claudin-2-mRNA nachgewiesen werden konnte,

kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine unspezifische Reaktion des Claudin-2-Antikörpers mit einem intrazellulären Epitop handelt. Damit fehlen im Vergleich zu den proximalen Tubuli *in vivo* in den NRK-52E-Zellen zumindest die in der Ratte charakteristischen Claudine -7 und -10. In den IHKE-1- und Caki-1-Zellen fehlt zusätzlich das für den Menschen charakteristische Claudin-2. Zu den Caki-1-Zellen ist außerdem anzumerken, dass in dieser Zelllinie alle untersuchten *Tight-Junction*-Proteine nur eine diffuse Lokalisierung in den Zellen aufwiesen. Im Gegensatz zu den anderen Zellen betraf dies auch Occludin und TJP1. Im Fall funktionsfähiger *Tight Junctions* sollten beide Proteine, unabhängig vom Expressionsmuster der untersuchten Claudine, an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert sein. Zusätzlich waren die Mannitol-Permeation in den Caki-1-Zellen vergleichsweise hoch. Zusammen mit der Morphologie der Zell-*Monolayer* weisen diese Befunde eindeutig darauf hin, dass diese Zelllinie unter den gegebenen Kulturbedingungen keine *Tight Junctions* ausbildet.

Zusammengefasst zeigen, mit Ausnahme der MDCKII-Zellen, alle immortalisierten Zelllinien also deutliche Abweichungen vom Expressionsverhalten der untersuchten *Tight-Junction*-Proteine in den proximalen Tubuli. Diese Abweichung spiegelt sich auch in den Dichtigkeitsuntersuchungen der Zell-*Monolayer* wider. Alle Zellen, mit Ausnahme der MDCKII-Zellen, zeigten eine hohe Mannitol-Permeation, ein Hinweis auf nicht ausgebildete *Tight Junctions*.

#### 3.5.4 Korrelation der elektrischen Widerstände mit den apparenten Permeationskoeffizienten von [<sup>14</sup>C]-Mannitol

Der TEER-Wert ist ein Maß für die „elektrische Dichtigkeit“ der *Tight Junctions*. Konkret wird mit dem TEER der Substanzfluss kleiner Ionen (hauptsächlich Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup>) durch die *Tight Junctions* gemessen. Die Höhe des TEER-Werts ist dabei invers proportional zum Ionenfluss (Gaillard and de Boer, 2000; Van Itallie *et al.*, 2008). Daher wird normalerweise angenommen, dass der durch höhere TEER-Werte angezeigte, geringere Ionenfluss eine höhere Dichtigkeit der *Tight Junctions* bedeutet und somit eine geringere parazelluläre Permeabilität zur Folge hat. Im Einklang mit diesem Modell steht die Beobachtung, dass die *Monolayer* der primären proximalen Tubuluszellen gegenüber den Zelllinien NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1 höhere TEER-Werte (niedrigerer Ionenfluss) und eine niedrigere Mannitol-Permeation aufweisen. Beim direkten Vergleich der beiden Größen zwischen den MDCKII-Zellen und den primären proximalen Tubuluszellen war allerdings ein scheinbar paradoxer Zusammenhang zu beobachten: Obwohl für die Primärzellen höhere TEER-Werte (niedrigerer Ionenfluss) gemessen wurden, war gleichzeitig auch eine höhere Mannitol-Permeation zu verzeichnen.

Verschiedene Untersuchungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass die *Tight-Junction*-Proteine in den intramembranösen Fibrillen verschiedenartige Transportsysteme mit unterschiedlicher Größen- und Ladungsselektivität ausbilden (Anderson and Van Itallie, 2009; Van Itallie *et al.*, 2008). In der aktuellen Literatur wird das gleichzeitige Vorhandensein von zwei parazellulären Transportwegen in den

*Tight Junctions* vorgeschlagen: 1) ein System ladungsabhängiger kleiner Poren mit einem Radius von etwa 4 Å und 2) ein ladungs- und größenunabhängiges System größerer Unterbrechungen in den *Tight Junction*-Strängen (Anderson and Van Itallie, 2009; Van Itallie *et al.*, 2008; Knipp *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 2001). Während das Porensystem für den Fluss von Ionen verantwortlich ist (und damit den elektrischen Widerstand beziehungsweise den TEER-Wert bestimmt), werden größere, ungeladene Moleküle mit einem Durchmesser  $>4$  Å, wie etwa Mannitol, durch das zweite System transportiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nur das Porensystem durch die Expressionsmuster der Claudine beeinflusst wird (Alexandre *et al.*, 2005; Anderson and Van Itallie, 2009; Furuse *et al.*, 2001; Nitta *et al.*, 2003). Die molekulare Basis der Kontrolle des zweiten Systems ist bisher hingegen nicht abschließend geklärt.

Mit Hilfe dieses Modells ist es möglich, die oben geschilderten Unterschiede zwischen MDCKII-Zellen und den primären proximalen Tubuluszellen zu erklären. Da die Permeation von Ionen und großen, ungeladenen Molekülen unabhängig voneinander erfolgt, geht ein erhöhter TEER-Wert nicht zwangsläufig mit einer verringerten parazellulären Permeabilität von Mannitol einher.

### 3.6 TRANSPORTEIGENSCHAFTEN DER UNTERSUCHTEN ZELLMODELLE

In präklinischen pharmakokinetischen Studien sind besonders die Transporter, die im Menschen mit dem Auftreten klinisch relevanter Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen in Verbindung gebracht werden von Interesse. In der Niere sind dabei vor allem die maßgeblich an der renalen tubulären Sekretion beteiligten und klinisch relevanten Aufnahme-Transporter OAT1, OAT3 und OCT2 von Bedeutung. Auch die ABC-Transporter MDR1, MRP2, MRP4 und BCRP sind in der Niere exprimiert. Darüber hinaus spielt auch noch eine Reihe weiterer, bisher weniger gut charakterisierter Transporter, wie etwa OCTN1, OCTN2 oder OAPT4C1 eine Rolle bei der renalen Exkretion von Arzneistoffen. In jüngster Zeit sind beispielsweise auch die beiden apikalen Efflux-Transporter MATE1 und MATE2-K in den Fokus der Aufmerksamkeit geraten, da durch *In-vitro*-Studien gezeigt wurde, dass diese vermutlich für einige vermeintlich OCT-vermittelte Wirkstoff-Wirkstoff-Interaktionen verantwortlich sind (Tsuda *et al.*, 2009).

Ein geeignetes *In-vitro*-Modell zur Vorhersage der Transporteigenschaften eines Wirkstoffs in den proximalen Tubuli sollte es im Idealfall ermöglichen die Interaktionen mit allen *in vivo* exprimierten Transportern voraussagen zu können. Um die Eignung der in dieser Arbeit untersuchten Zellmodelle als ein solches Modell zu beurteilen, wurde daher ein umfassender Vergleich der Expressions- und Aktivitätsmuster relevanter Transporter durchgeführt. Berücksichtigt wurde dabei eine Auswahl an insgesamt 21 ABC-, SLC-, und SLCO-Transportern, für die eine Beteiligung an der renalen tubulären Reabsorption

und Sekretion von Arzneistoffen bekannt ist oder angenommen wird (Morrissey *et al.*, 2013; Giacomini *et al.*, 2010; Lee and Kim, 2004; Wright, 2004; Anzai *et al.*, 2005).

### 3.6.1 Expression von Transport-Proteinen in frisch isolierten primären Nierenzellen

In den frisch isolierten primären Nierenzellen konnten, mit einer Ausnahme, alle der 19 untersuchten Arzneistofftransporter auf mRNA-Ebene detektiert werden. Lediglich PEPT1 konnte in den Zellen nicht nachgewiesen werden. Da die Expression von PEPT1 in der Niere der Ratte in der Literatur beschrieben wurde (Lee and Kim, 2004; Terada *et al.*, 1997), besteht die Vermutung, dass der verwendete Primer möglicherweise keine ausreichende Spezifität für das Zielgen besitzt. Die übrigen Expressionsdaten sind hingegen konsistent mit Literaturdaten. Alle Transporter, von denen bekannt ist, dass sie in der Niere exprimiert werden, konnten in den frisch isolierten proximalen Tubuluszellen ebenfalls nachgewiesen werden.

Umfassende Daten bezüglich des Expressionsprofils von Transportern in der Niere finden sich bei Augustine *et al.* (Augustine *et al.*, 2005). Obwohl die Expressionsuntersuchung von Augustine *et al.* mit RNA aus Gesamtnierenhomogenat durchgeführt wurde, sollte das Expressionsprofil vergleichbar zu dem von frisch isolierten proximalen Tubuluszellen sein, da die Expression von Arzneistofftransportern in den Nephronen hauptsächlich auf die proximalen Tubuli beschränkt ist. Tatsächlich zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit den von Augustine *et al.* erhobenen Daten. Zur Veranschaulichung sind die relativen Expressionsstärken der beiden Datensätze in Tabelle 3-3 dargestellt. Wie in den frisch isolierten Primärzellen wurde für Oct2 und Oat1 im Gesamtnierenhomogenat eine im Vergleich zu den übrigen Transportern sehr hohe mRNA-Menge detektiert. Dies konnte auch durch Studien von Lash *et al.* bestätigt werden (Lash *et al.*, 2007). Ebenfalls gut mit dem von Augustine *et al.* beschriebenen Expressionsprofil korrelierte die relativ niedrige Expression der ABC-Transporter Mdr1, Mrp4 und Mrp4, sowie der Aufnahme-Transporter Oat2 und Octn1 in den frisch isolierten Primärzellen. Eine moderate Expression wurde in beiden Fällen für Oct1, Pept2, Oatp1a1 und Oatp1a3 beobachtet. Interessanterweise wurde für Pept1, welches in den frisch isolierten Primärzellen in den Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte, auch durch Augustine *et al.* nur eine geringe Expression beobachtet. Ein Unterschied zeigte sich dagegen in der Expression der beiden Aufnahme-Transporter Oat3 und Octn2. Hier war die in der Niere gefundene Menge an mRNA vergleichsweise hoch, bei den frisch isolierten Primärzellen wurden hingegen im Vergleich zu den anderen Transportern nur moderate Mengen detektiert.

**Tabelle 3-3: Vergleich der relativen Expressionsprofile der untersuchten Transporter in frisch isolierten proximalen Tubuluszellen und Nierenhomogenat aus der Ratte**

Familie	Protein	Gen	PRPTC frisch	Niere*
ABC	<b>Mdr1a</b>	<i>Abcb1a</i>		
	<b>Mrp2</b>	<i>Abcc2</i>		
	<b>Mrp4</b>	<i>Abcc4</i>		
SLC15	<b>Pept1</b>	<i>Slc15a1</i>		
	<b>Pept2</b>	<i>Slc15a2</i>		
SLC22	<b>Oct1</b>	<i>Slc22a1</i>		
	<b>Oct2</b>	<i>Slc22a2</i>		
	<b>Octn1</b>	<i>Slc22a4</i>		
	<b>Octn2</b>	<i>Slc22a5</i>		
	<b>Oat1</b>	<i>Slc22a6</i>		
	<b>Oat2</b>	<i>Slc22a7</i>		
	<b>Oat3</b>	<i>Slc22a8</i>		
	<b>Oatp1a1</b>	<i>Slco1a1</i>		
SLCO	<b>Oatp1a3</b>	<i>Slco1a3</i>		

\*Daten nach Augustine *et al.* Angegeben sind die relativen Expressionsstärken, bezogen auf den jeweiligen Datensatz. Expressionsstärke: niedrig  hoch

### 3.6.2 Expression von Transport-Proteinen in kultivierten primären Nierenzellen

Während zu Beginn der Kultivierung der primären Tubuluszellen die Transporter-Expression noch vergleichbar zur *In-vivo*-Situation war, war die Expression zum späteren Kultivierungszeitpunkt (5 Tage) deutlich verändert. Die Expressionsraten aller Transporter war deutlich vermindert. Im Falle einiger Transporter wie etwa Mdr1 und Mrp2, sowie insbesondere bei den organischen Anionen-Transportern Oat1, Oat2, Oat3, Oat5, Urat1 und Oatp1a1, Oatp1a3 und Oatp1a4 ging die Expression um mindestens 95 % auf ein minimales Expressionsniveau zurück. Ebenfalls ein deutlicher Rückgang, allerdings mit einem höheren verbleibenden Expressionsniveau war für die beiden ABC-Transporter Mrp4 und Bcrp, für Pept2, für die organischen Kationen-Transporter Oct2 und Octn2, sowie für Mate1 zu verzeichnen. Der starke Rückgang in der Transporter-Expression steht in Einklang mit der Hypothese, dass durch die Kultivierung der primären Zellen eine Dedifferenzierung ausgelöst wird, die zur Verminderung der Transporter-Expression führt. Die Verminderung der Expression ist assoziiert mit einem Verlust der für proximale Tubuli typischen Markerproteine wie alkaline Phosphatase, Alanin-Amino-peptidase, Villin 1 und  $\gamma$ -Glutamyltransferase 1 (siehe Kapitel 3.4.3). Interessanterweise blieben allerdings nach längerer Kultivierung die *Tight Junctions* intakt, was sich durch einen sehr hohen TEER-Wert und eine niedrige Mannitol-Permeation widerspiegelte (siehe Kapitel 3.5.2).

In der Literatur wurden durch Brown *et al.* Kulturen humaner primärer proximaler Tubuluszellen bezüglich der Expression einiger Arzneistofftransporter untersucht (Brown *et al.*, 2008). Dort wurde gezeigt, dass die Zellen nach 10 Tagen Kulturdauer mRNA der Transporter MDR1, MRP2, BCRP, OCT2, OCTN2, OAT1 und OAT3 exprimieren. Mit Ausnahme von OAT1 konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen für alle der genannten Transporter die Expression der entsprechenden homologen Transporter auch in den kultivierten primären proximalen Tubuluszellen aus der Ratte nachgewiesen werden. Allerdings war die Expressionsstärke im Fall von Mdr1, Mrp2 und Oat1 nur knapp über der Nachweisgrenze. Leider ist ein Vergleich der relativen Expressionsverhältnisse der Transporter zwischen den von Brown *et al.* untersuchten humanen und den in dieser Arbeit untersuchten Primärzellen aus der Ratten nicht möglich, da die Expressionsstärken in der Publikation von Brown *et al.* nicht quantifiziert wurden. Daher wurde von Brown *et al.* auch die Expressionsstärke in den kultivierten Primärzellen nicht mit der Expressionsstärke in frisch isolierten Zellen verglichen. Aus diesem Grund ist leider auch keine Aussage darüber gemacht worden, ob während der Kulturdauer eine Regulation der Transporter-Expression stattgefunden hat, wie es in dieser Arbeit für die primären proximalen Tubuluszellen aus der Ratte beobachtet wurde.

### 3.6.3 Expression von Transport-Proteinen in den Nierenzelllinien

Ebenso wie in den kultivierten primären Nierenzellen zeigte sich auch in den untersuchten Zelllinien NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1 ein deutlicher Unterschied zum Expressionsmuster der Arzneistofftransporter in den frisch isolierten Primärzellen.

In den NRK-52E-Zellen wurden zwar einige der untersuchten Transporter gefunden, allerdings war 1) die Menge an mRNA der einzelnen Transporter in fast allen Fällen wesentlich niedriger als in den frisch isolierten Primärzellen und 2) stimmte das relative Expressionsprofil der Transporter nicht mit dem *In-vivo*-Expressionsprofil in der Niere der Ratte überein. Nachgewiesen werden konnten die ABC-Transporter Mdr1, Mrp4 und Bcrp, sowie Oct1, Oct2, Octn2 und Mate1. Für die weiteren in der Niere der Ratte exprimierten Transporter konnte kein Nachweis erfolgen. Auffällig an diesem Expressionsmuster ist vor allem das vollständige Fehlen aller organischen Anionen-Transporter aus der SLC22- und der SLCO-Familie. Insgesamt glich das Expressionsmuster der Zellen damit dem der kultivierten Primärzellen (siehe Tabelle 2-6). Angesichts der Tatsache, dass es sich in beiden Fällen um aus den proximalen Tubuli der Ratte isolierte und anschließend kultivierte Zellen handelt, erscheint dies plausibel. Der Unterschied der NRK-52E-Zelllinie zu den kultivierten Primärzellen lag vor allem in deren zusätzlichen Expression moderater Mengen Mdr1, Oct1 und Octn2. In der Literatur finden sich vereinzelte Berichte über die Expression einiger Arzneistofftransporter in den NRK-52E-Zellen, die mit den hier gemachten Beobachtungen gut übereinstimmen. Die Abwesenheit organischer Anionen-Transporter in den Zellen wurde etwa auch von Lash *et al.* beobachtet. Dort wurde die Expression von Oat1, Oat3, Oatp1a3 und

Mrp2 in den Zellen untersucht. Übereinstimmend mit den in dieser Arbeit generierten Daten konnte für keinen der genannten Transporter eine Expression in den NRK-52E-Zellen gefunden werden (Lash *et al.*, 2007). Ein Bericht über die Expression der ABC-Transporter Mdr1, Mrp2 und Mrp4 findet sich bei van de Water *et al.* In Übereinstimmung mit den hier gezeigten, und im Fall von Mrp2 durch Lash *et al.* bestätigten, Daten wurden Mdr1 und Mrp4, aber nicht Mrp2 in den Zellen exprimiert (van de Water *et al.*, 2007).

Ähnlich wie die NRK-52E-Zellen exprimierten auch die beiden humanen immortalisierten Zelllinien IHKE-1 und Caki-1 einige der untersuchten Transporter, darunter MRP4, OCTN1, OCTN2, OATP4C1 und MATE1. In keiner der beiden Zelllinien konnte hingegen ein Nachweis von PEPT1, OAT1, OAT2, OAT3, OAT4 und URAT1 erfolgen, obwohl für diese Transporter eine Expression in der menschlichen Niere bekannt ist (Hilgendorf *et al.*, 2007; Nishimura and Naito, 2005). Die Expressionsprofile der beiden Zelllinien unterschieden sich sowohl im direkten Vergleich zueinander als auch im Vergleich zu der aus der Ratte stammenden NRK-52E-Zelllinie.

Im direkten Vergleich zueinander unterschieden sich die beiden Zelllinien vor allem dadurch, dass die apikal exprimierten Efflux-Transporter MRP2, BCRP und MATE2-K ausschließlich in IHKE-1-Zellen, der basolaterale Aufnahme-Transporter OCT2 hingegen ausschließlich in Caki-1-Zellen nachgewiesen werden konnte. Eine aufschlussreiche Erklärung für die Unterschiede im Expressionsmuster der beiden Zelllinien könnte deren unterschiedliche Herkunft liefern. Die IHKE-1-Zellen wurden ursprünglich aus dem renalen Kortex eines menschlichen Fötus isoliert, während die Caki-1-Zellen aus dem Nierenkarzinom eines 49-jährigen Patienten stammen. Somit kommen mehrere Faktoren in Frage, die die Transporter-Expression beeinflussen können. Zum einen handelt es sich aufgrund der unterschiedlichen angewendeten Isolationsmethoden vermutlich um Zellen aus verschiedenen Nephron-Segmenten mit entsprechend unterschiedlichen Expressionsprofilen. Zum anderen ist seit langem bekannt, dass die Expression von ABC-Transportern wie MRP2 und BCRP im Zusammenhang mit der *Multidrug resistance* in malignen Tumoren verändert ist (Ee *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2006; Hinoshita *et al.*, 2000). Darüber hinaus finden sich auch Hinweise, dass die Expression der betreffenden Transporter OCT2, MRP2 und BCRP, zumindest in der Ratte beziehungsweise in der Maus, einer altersabhängigen Regulation unterliegen (Morrissey *et al.*, 2013).

Da bekannt ist, dass Spezies-Unterschiede in der Transporter-Expression von proximalen Tubuli der Ratte und des Menschen existieren, ist es nicht überraschend, dass sich das Expressionsprofil zwischen IHKE-1-Zellen und Caki-1-Zellen auf der einen und NRK-52E und den kultivierten Primärzellen auf der anderen Seite unterscheidet. Einer der auffälligsten Unterschiede der beiden humanen Zelllinien zu den aus der Ratte stammenden Zellen war die Expression von OCTN1 und OATP4C1. Deren Homologe Octn1 und Oatp4c1 wurden weder in NRK-52E-Zellen noch in kultivierten Primärzellen aus der Ratte

gefunden. Möglicherweise ist dieser Spezies-spezifische Unterschied in der OCTN1/Octn1-Expression mit dem bisher nur in der Ratte identifizierten Transporter Octn3 assoziiert (Indiveri *et al.*, 2013). Dieser könnte, aufgrund eines mit OCTN1/Octn1 überlappenden Substratspektrums, in den kultivierten Rattenzellen anstelle von Octn1 exprimiert werden. Wie in den kultivierten Rattenzellen konnte auch in den beiden humanen Zelllinien keiner der organischen Anionen-Transporter OAT1–3 und URAT1 detektiert werden. Die Expression von OCTN2, MRP4 und MATE1 konnte hingegen sowohl in allen untersuchten Zelllinien, als auch in den kultivierten Primärzellen in moderaten Mengen dargestellt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Expressionsprofile der immortalisierten Zelllinien NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1 sich deutlich von denen der proximalen Tubuli unterscheiden. Mehrere in den Nieren der Ratte beziehungsweise des Menschen exprimierte Transporter konnten in den Zelllinien nicht nachgewiesen werden.

### 3.6.4 Aufnahmeversuche mit prototypischen Substraten

Da die Stärke der mRNA-Expression nicht zwingend einen Rückschluss auf die Aktivität der Transporter erlaubt, wurden mit den *Monolayern* der immortalisierten Zelllinien, sowie mit den kultivierten primären proximalen Tubuluszellen Aufnahmeversuche durchgeführt, um deren Transporter-Aktivitäten zu evaluieren. In der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen wird die Aufnahme anionischer Arzneistoffe vorwiegend durch OAT1 und OAT3 und die Aufnahme kationischer Arzneistoffe vorwiegend durch OCT2 vermittelt. Um festzustellen, inwieweit die untersuchten Zellmodelle diese Transporteigenschaften widerspiegeln, wurden für die Aufnahmeversuche möglichst spezifische Substrate für die genannten Transporter eingesetzt.

#### 3.6.4.1 Transport organischer Anionen

Als geeignetes Modellsubstrat für die organischen Anionen-Transporter OAT1/Oat1 und OAT3/Oat3 wurde p-Aminohippurat (PAH) gewählt, da es als Substrat für beide Transporter bekannt ist. Es hat mit einem  $K_m$ -Wert von 4–30  $\mu\text{M}$  eine etwas höhere Affinität zu OAT1, der  $K_m$ -Wert für OAT3 liegt etwas niedriger bei etwa 90  $\mu\text{M}$  (Ueo *et al.*, 2005; Cha *et al.*, 2001; Islinger *et al.*, 2001).

Bei den Aufnahmeversuchen mit PAH zeigte sich sowohl bei den untersuchten Zelllinien MDCKII, NRK-52E, IHKE-1 und Caki-1 als auch bei den kultivierten Primärzellen ein geringer zeitabhängiger Anstieg der gemessenen Radioaktivität. Da sich auch bei längerer Inkubation (bis zu 30 min) keine Sättigung erkennen ließ und keiner der eingesetzten OAT-spezifischen Inhibitoren einen Effekt zeigte, wurde davon ausgegangen, dass es sich nicht um einen aktiven OAT-vermittelten Transportprozess handelt. Zu vergleichbaren Ergebnissen mit NRK-52E-Zellen kamen auch Lash *et al.*, die in der Zelllinie ebenfalls

keinen OAT-vermittelten Transport nachweisen konnten (Lash *et al.*, 2007). Die beschriebenen Aufnahmeversuche wurden mit auf mit Rattenschwanz-Kollagen beschichteten 24-Loch-Zellkulturplatten kultivierten Zell-Monolayern durchgeführt. Um einen möglichen Einfluss unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die Transporter-Aktivität zu berücksichtigen, wurden auch bidirektionale Transportversuche mit auf permeablen Membranfiltereinsätzen kultivierten Primärzellen durchgeführt. Jedoch konnte auch unter diesen Bedingungen kein Hinweis auf einen aktiven Transport von PAH gefunden werden. Die geschilderten Beobachtungen korrelierten sehr gut mit den Ergebnissen der mRNA-Expressionsanalysen. Auch auf mRNA-Ebene konnte weder in den kultivierten Primärzellen noch in den NRK-52E-, IHKE-1- oder Caki-1-Zellen eine Expression von OAT1/Oat1 oder OAT3/Oat3 nachgewiesen werden. Somit lässt sich festhalten, dass die untersuchten Zell-Monolayer sich nicht zur Untersuchung des renalen Transports organischer Anionen eignen. Allerdings wäre für die Zelllinien NRK-53E und IHKE-1 aufgrund der fehlenden Hintergrundaktivität der endogenen Transporter eine Verwendung als Wirtszellen für die Transfektion von organischen Anionen-Transportern wie OAT1 oder OAT3 denkbar. Die Caki-1-Zelllinie erscheint dafür weniger gut geeignet, da diese untypische Wachstumseigenschaften aufwies und keine konfluenten Monolayer ausbildeten. Weiterhin sei ein interessanter Unterschied zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Primärzellen aus der Ratte und den von Brown *et al.* beschriebenen aus humanen Nieren isolierten Primärzellen erwähnt. Für letztere wurde durch Brown *et al.* ein OAT1/OAT3-vermittelter Transport von PAH gezeigt (Brown *et al.*, 2008). Es ist zu vermuten, dass dieser Unterschied auf eine Spezies-spezifische Anpassung der verschiedenen Primärzellen an die Kulturbedingungen zurückgeht.

Im Gegensatz zu den kultivierten Zellen wurde in den frisch isolierten proximalen Tubuluszellen eine deutliche Aufnahme von PAH festgestellt. Zudem war die Aufnahme durch Probenecid, Diclofenac und Ibuprofen inhibierbar, was auf eine Beteiligung von Oat1 und Oat3 hindeutet. Insbesondere für Oat1 wurde auf mRNA-Ebene eine hohe Expression in den Zellen gefunden, so dass die mRNA-Expressionsdaten gut mit den Resultaten der Aufnahmeversuche übereinstimmen. Die PAH-Aufnahme war allerdings auch durch hohe Konzentrationen der eingesetzten Inhibitoren maximal um 50 % (500 µM Probenecid und Diclofenac) beziehungsweise um 55 % (500 µM Ibuprofen) hemmbar. Da die in der Literatur beschriebenen IC<sub>50</sub>-Werte der eingesetzten Inhibitoren für den Transport von PAH deutlich unter der eingesetzten Konzentration von 500 µM liegen (Elsby *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2000; Khamdang *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2001), ist davon auszugehen, dass neben Oat1 und Oat3 weitere Transporter an der PAH-Aufnahme in die Zellen beteiligt sind.

### 3.6.4.2 Transport organischer Kationen

Zur Untersuchung des Transports organischer Kationen wurde auf 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) zurückgegriffen. MPP+ ist ein klassisches Kationen-Modellsubstrat für die organischen Kationen-Transporter OCT1 und OCT2 (Gorboulev *et al.*, 1997; Minematsu *et al.*, 2010). Darüber hinaus besitzt es aber auch eine geringe Affinität für OCTN1 und OCTN2 sowie eine hohe Affinität zu MATE1 und MATE2-K (Jong *et al.*, 2011; Wermuth, 2011; Ahmadimoghaddam *et al.*, 2012; König *et al.*, 2011; Astorga *et al.*, 2012).

Ähnlich wie auch schon bei der Aufnahme von PAH, wurde in den untersuchten Zelllinien und in den kultivierten Primärzellen bei den Aufnahmeversuchen mit MPP+ ein zeitabhängiger Anstieg der gemessenen Radioaktivität beobachtet. Im Unterschied zu den Aufnahmeversuchen mit PAH war die Aufnahme von MPP+ jedoch durch die eingesetzten Inhibitoren hemmbar, was ein Hinweis auf eine aktive, Transporter-vermittelte Aufnahme ist. Die höchste Aufnahme wurde in Caki-1-Zellen beobachtet. Darüber hinaus konnte insbesondere in der Caki-1-Zelllinie eine deutliche Inhibition der MPP+-Aufnahme gezeigt werden. In den übrigen Zelllinien sowie in den kultivierten Primärzellen waren demgegenüber nur geringere Effekte zu beobachten.

Es stellte sich daher die Frage, ob die Caki-1-Zellen als Modell zur Untersuchung des Transports organischer Kationen in den proximalen Tubuli geeignet sind. Durch die Untersuchung der mRNA-Expressionsprofile wurde zuvor gezeigt, dass in den Caki-1-Zellen auf mRNA-Ebene kein OCT2 exprimiert wird. Unter der Voraussetzung, dass die Protein-Expression von OCT2 mit der mRNA-Expression in den Zellen korreliert, ist daher davon auszugehen, dass die beobachtete Aufnahme von MPP+ nicht durch OCT2 vermittelt wurde. Betrachtet man das mRNA-Expressionsprofil der Zellen, kommen als für die MPP+-Aufnahme verantwortliche Transporter stattdessen beispielsweise OCTN1 und OCTN2 in Frage. Beide Transporter wurden in moderaten Mengen auf mRNA-Ebene in den Zellen exprimiert und es ist bekannt, dass beide eine geringe Affinität zu MPP+ besitzen. Weiterhin denkbar ist eine MATE-vermittelte Aufnahme. Obwohl MATE1 und MATE2-K in den proximalen Tubuli *in vivo* überwiegend für den Efflux kationischer Substanzen verantwortlich sind, kann durch beide Transporter auch eine Aufnahme verschiedener organischer Kationen, darunter MPP+, vermittelt werden (Tanihara *et al.*, 2007). Literaturdaten deuten zudem darauf hin, dass die Caki-1-Zellen organische Kationen verstärkt durch OCT3 aufnehmen, dessen Expression in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht wurde (Glube and Langguth, 2008). Jedoch ist wie bereits erwähnt, für den Transport organischer Kationen in den proximalen Tubuli *in vivo* hauptsächlich OCT2 von Bedeutung. Daher lässt sich, unabhängig davon welcher der genannten Transporter für die MPP+-Aufnahme in die Zellen verantwortlich waren, abschließend festhalten, dass die Caki-1-Zelllinie als Modell zur Untersuchung des integrierten Arzneistofftransports in den proximalen Tubuli nur wenig geeignet erscheint.

In den frisch isolierten proximalen Tubuluszellen konnte im Gegensatz zu den kultivierten proximalen Tubuluszellen eine deutliche aktive, Transporter-vermittelte Aufnahme von MPP<sup>+</sup> festgestellt werden. Diese war nach 15 min sättigbar und durch die eingesetzten Inhibitoren Cimetidin, Desipramin und Verapamil inhibierbar. Verschiedene Beobachtungen deuteten darauf hin, dass dieser Transport zu einem großen Teil durch Oct2 vermittelt wurde. Zum einen war die mRNA-Expression von Oct2 in den Zellen besonders hoch, zum anderen war auch das Inhibitionsprofil der eingesetzten Inhibitoren ein Hinweis auf einen Oct2-vermittelten Transportprozess, da die Inhibition durch Verapamil wesentlich stärker war als die Inhibition durch Cimetidin. Dies passt zu Literaturdaten, in denen Verapamil als stärkerer OCT2-Inhibitor beschrieben ist als Cimetidin. Beispielsweise wurden durch Minematsu *et al.* IC<sub>50</sub>-Werte von 13 µM für Verapamil und 110 µM für Cimetidin für den Transport des OCT2-Substrats YM155 in OCT2-überexprimierenden HEK293-Zellen publiziert (Minematsu *et al.*, 2010). Auch für den OCT2-vermittelten MPP<sup>+</sup>-Transport wurde eine stärkere Inhibition von Verapamil gegenüber Cimetidin beobachtet (Zolk *et al.*, 2009).

Abschließend kann festgehalten werden, dass sich sowohl die Transporteigenschaften des organischen Anions PAH, als auch die des organischen Kations MPP<sup>+</sup> in den immortalisierten Zelllinien und den kultivierten proximalen Tubuluszellen von den Transporteigenschaften in den frisch isolierten proximalen Tubuluszellen mitunter deutlich unterscheiden. Lediglich die frisch isolierten Zellen zeigten typische Transporteigenschaften für die untersuchten Modellsubstrate. Dies steht in Einklang mit den zuvor beobachteten Unterschieden in der mRNA-Expression der untersuchten Transporter. Somit lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit vorgestellten frisch isolierten proximalen Tubuluszellen ein vielversprechendes Modell zur Untersuchung des Arzneistofftransports in den proximalen Tubuli darstellen. Die untersuchten immortalisierten Zelllinien und die kultivierten Primärzellen erscheinen für diesen Zweck unter den untersuchten Bedingungen hingegen nicht geeignet.

### 3.6.5 Regulation der Transporter-Expression

Für viele ABC-Transporter wie MDR1, BCRP, oder verschiedene Vertreter der MRPs sind seit längerem Signalwege bekannt, die die Expression der entsprechenden Transportergene regulieren. Auch die beteiligten Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise der Pregnan-X-Rezeptor (PXR), der konstitutive Androstan-Rezeptor (CAR) oder der Glukokortikoid-Rezeptor (GR) sind inzwischen identifiziert worden (Miller, 2010). Im Gegensatz dazu hat die Aufklärung der für die Regulation der Genexpression der (renalen) Aufnahme-Transporter der SLC-Superfamilie verantwortlichen Mechanismen erst vor kurzem begonnen. Entsprechend wenig ist über die beteiligten Signalwege und Transkriptionsfaktoren bekannt. Daher wurden in dieser Arbeit verschiedene Ansätze untersucht, um der Verringerung der Expression der Transportproteine während fortschreitender Kultivierung der primären proximalen Tubuluszellen entgegenzuwirken.

Ein denkbarer Ansatz die Expression der Aufnahme-Transporter zu beeinflussen, ist der Eingriff in Signal-Transduktionswege, die für die renale Differenzierung verantwortlich sind. Leider sind die genauen molekularen Grundlagen der terminalen Differenzierung der renalen Epithelzellen, das heißt die Faktoren, die die Entwicklung zu den einzelnen Nephronsegmenten, etwa zum proximalen Typus hin steuern, nicht im Detail bekannt (Gallegos *et al.*, 2012). Wesentlich besser verstanden sind hingegen die Grundlagen der frühen renalen Epithelzell-Differenzierung. So ist seit längerer Zeit bekannt, dass der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg wesentlich an der frühen Nephrogenese beteiligt ist (El-Dahr *et al.*, 2008). Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist während der Embryogenese an der Ausbildung zahlreicher Organe beteiligt. Mutationen führen zu verschiedenen Krankheiten wie beispielsweise Brust- und Prostatakrebs und Glioblastomen oder Typ-2-Diabetes. Eine Aktivierung dieses Signalweges führt durch eine Protein-Signalkaskade zur Freisetzung von  $\beta$ -Catenin, welches im Zellkern akkumuliert und verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert. Die Inhibition des Signalweges führt umgekehrt zum Abbau von  $\beta$ -Catenin in der Zelle und eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren findet nicht statt. Für Nierenzellen ist beispielsweise bekannt, dass die Aktivierung des Signalweges durch den Wnt-Liganden *WNT4* unter anderem die Differenzierung des metanephrischen Mesenchyms zu Nephron-Epithelzellen steuert (Stark *et al.*, 1994). Durch die Behandlung der kultivierten proximalen Tubuluszellen mit Regulatoren des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs konnte jedoch keine Erhöhung der Aufnahme von PAH oder MPP<sup>+</sup> festgestellt werden. Es kann daher vermutet werden, dass der Signalweg keine Auswirkungen auf die Expression der am Transport dieser Modellssubstrate beteiligten Transporter hat.

Ebenfalls von Bedeutung für die Entwicklung der proximalen Tubuluszellen *in vivo* ist der *Notch*-Signalweg. *Notch*-Signale sind mitbestimmend für die Segmentierung und Differenzierung der proximalen Tubulussegmente während der Nephrogenese. Beteiligt sind dabei vor allem der *Notch-2*-Rezeptor und der *Notch*-Ligand Delta-like 1 (*DLL1*) (Cheng *et al.*, 2007; Gallegos *et al.*, 2012; Kopan *et al.*, 2007). Durch Behandlung der kultivierten proximalen Tubuluszellen mit dem in der Literatur als Aktivator des Signalweges beschriebenen DAPT konnte eine signifikante Erhöhung der PAH-Aufnahme gezeigt werden, was darauf hinweist, dass dieser Signalweg an der Regulation der Aufnahmetransporter beteiligt ist.

Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der Transporter-Expression war die Behandlung der Zellen mit den Steroidhormonen Testosteron und Hydrocortison, welche verschiedene Transkriptionsfaktoren wie PXR oder CAR aktivieren. Erste Hinweise auf eine hormonelle Regulation der Expression von Transportern der SLC-Familie finden sich etwa bei Urakami *et al.* (Urakami *et al.*, 2000). Dort wurde im Rattenmodell durch die *In-vivo*-Administration von Testosteron eine Erhöhung der mRNA-Expression und der Aktivität von Oct2 beobachtet. Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, dass die mRNA-

Menge von Oct2 in männlichen Mäusen höher als in weiblichen Mäusen ist, was als ein weiterer Hinweis auf die Rolle von Testosteron bei der Regulation der Oct2-Expression gewertet werden kann (Slitt *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte hingegen keine Veränderung der Oct2-Aktivität nach Behandlung der kultivierten Primärzellen mit Testosteron beobachtet werden.

Neben den genannten Signaltransduktionswegen und Hormonen wurde auch der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Transportfähigkeit der kultivierten proximalen Tubuluszellen untersucht. Dass diese eine ganze Reihe unterschiedlicher zellulärer Reaktionen, wie Proliferation, Zellmotilität und Differenzierung auslösen, ist seit langem bekannt (Ernst *et al.*, 2001). Insbesondere spielen einige Wachstumsfaktoren, wie auch der Wnt/ $\beta$ -Catenin- und der Notch-Signalweg, eine Rolle bei der Embryogenese und Differenzierung der Nieren im Allgemeinen, sowie bei der Differenzierung der verschiedenen Nephron-Segmente während der Nephrogenese im Speziellen (Avner, 1990; Avner and Sweeney Jr, 1990). So wurde beispielsweise durch *In-vitro*-Studien gezeigt, dass HGF die Ausbildung tubulärer Strukturen in primären renalen Epithelzellen einleitet (Bowes *et al.*, 1999). In den proximalen Tubuli *in vivo* wurden außerdem spezifische Rezeptoren für HGF, EGF oder IGF-1 nachgewiesen (Hammerman and Miller, 1993; Haug *et al.*, 1998; Jehle *et al.*, 1996). Im Tiermodell stellte sich heraus, dass diese dort die Proliferation und Regeneration der proximalen Epithelzellen regulieren (Hammerman, 1998; Igawa *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass beispielsweise HGF auch die Differenzierung zu proximalen Tubuluszellen, etwa durch die verstärkte Ausbildung von Mikrovilli in der apikalen Membran, reguliert (Ernst *et al.*, 2001). Im Einklang dazu ließen sich bei der Behandlung der kultivierten proximalen Tubuluszellen einige interessante Tendenzen in Bezug auf die Transportfähigkeit beobachten. Besonders die Aufnahme von PAH war nach Behandlung mit HGF, FGF-1, EGF und dem Wachstumsfaktor-Mix leicht erhöht. Durch den Einsatz von 10 ng/ml EGF konnte außerdem eine gesteigerte MPP<sup>+</sup>-Aufnahme beobachtet werden. Inwieweit diese Beobachtungen auf eine Regulation der Transporter-Expression zurückzuführen sind beziehungsweise welche Transporter betroffen sind, stellt eine interessante Fragestellung für weiterführende Studien dar.

Die Reduktion der Transporter-Expression könnte auch die Konsequenz eines reduzierten Substratangebots *in vitro* sein. Um zu überprüfen, ob eine Erhöhung der Substratkonzentration aufgrund eines Rückkopplungsmechanismus in einer Induktion der Transporter-Expression resultiert, wurde dem Kultivierungsmedium Kreatinin zugesetzt. Kreatinin liegt im Urin des Menschen mit Konzentrationen zwischen 5-12 mM vor (Barr *et al.*, 2005). Es wird zum Großteil passiv durch glomeruläre Filtration sekretiert. Ein Teil (etwa 15–20 %) wird aber auch aktiv durch tubuläre Sekretion aus dem Körper ausgeschieden (Boeniger *et al.*, 1993). Dabei wird Kreatinin von OCT2 und MATE1/MATE2-K über das Interstitium aus den peritubulären Kapillaren aufgenommen und in das Tubuluslumen transportiert.

Nach Behandlung der Zellen mit 25 mM Kreatinin war ein auffälliger Effekt zu beobachten: Während der Einfluss auf die Aufnahme von PAH nur gering ausfiel, wurde mit einer Steigerung der MPP<sup>+</sup>-Aufnahme um  $176,0 \pm 8,1$  % der stärkste Effekt aller eingesetzten Substanzen beobachtet. Dieser ausgeprägte Effekt wurde interessanterweise nur bei der gegenüber der *In-vivo*-Situation erhöhten Konzentration von 25 mM beobachtet. Bei einer Konzentration von 5 mM, was physiologisch unauffällig ist, konnte hingegen kein Effekt festgestellt werden. Es ist daher denkbar, dass die erhöhte MPP<sup>+</sup>-Aufnahme einen Anpassungsmechanismus der Zellen an die erhöhte Kreatinin-Konzentration ist. Durch die erhöhte Kreatinin-Konzentration im Urin könnte es beispielsweise zu einer erhöhten Aktivität oder Expression von OCT2 und MATE1/MATE2-K kommen, um verstärkt Kreatinin auszuscheiden. Denkbar ist dazu ein ähnlicher Mechanismus, wie er etwa für die Regulation der Expression von ABC-Transportern durch PXR oder CAR bekannt ist. Diese beiden Transkriptionsfaktoren werden sowohl durch Xenobiotika, als auch durch die Konzentration endogener Liganden (beispielsweise Gallensäuren) gesteuert. Durch Kreatinin könnte eine ähnliche intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt werden, welche letztendlich durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer Erhöhung der Transporter-Expression führt.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Ahmadimoghaddam, D., Hofman, J., Zemankova, L., Nachtigal, P., Dolezelova, E., Cerveny, L., Ceckova, M., Micuda, S., and Staud, F. (2012). Synchronized activity of organic cation transporter 3 (Oct3/Slc22a3) and multidrug and toxin extrusion 1 (Mate1/Slc47a1) transporter in transplacental passage of MPP+ in rat. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *128*, 471–481.
- Aldridge, G.M., Podrebarac, D.M., Greenough, W.T., and Weiler, I.J. (2008). The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J. Neurosci. Methods* *172*, 250–254.
- Alexandre, M.D., Lu, Q., and Chen, Y.-H. (2005). Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl<sup>-</sup> conductance and increases the paracellular Na<sup>+</sup> conductance in LLC-PK1 cells. *J. Cell Sci.* *118*, 2683–2693.
- Anderson, J.M., and Van Itallie, C.M. (2009). *Physiology and Function of the Tight Junction*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *1*, a002584–a002584.
- Anderson, J.M., Van Itallie, C.M., and Fanning, A.S. (2004). Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 140–145.
- Anzai, N., Jutabha, P., Kanai, Y., and Endou, H. (2005). Integrated physiology of proximal tubular organic anion transport. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* *14*, 472–479.
- Astorga, B., Ekins, S., Morales, M., and Wright, S.H. (2012). Molecular Determinants of Ligand Selectivity for the Human Multidrug and Toxin Extruder Proteins MATE1 and MATE2-K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *341*, 743–755.
- Augustine, L.M., Markelewicz, R.J., Jr, Boekelheide, K., and Cherrington, N.J. (2005). Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *33*, 182–189.
- Avner, E.D. (1990). Polypeptide growth factors and the kidney: a developmental perspective. *Pediatr. Nephrol.* *4*, 345–353.
- Avner, E.D., and Sweeney Jr, W.E. (1990). Polypeptide growth factors in metanephric growth and segmental nephron differentiation. *Pediatr. Nephrol.* *4*, 372–377.
- Baer, P.C., Nockher, W.A., Haase, W., and Scherberich, J.E. (1997). Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation. *Kidney Int.* *52*.
- Baer, P.C., Bereiter-Hahn, J., Schubert, R., and Geiger, H. (2006). Differentiation status of human renal proximal and distal tubular epithelial cells in vitro: Differential expression of characteristic markers. *Cells Tissues Organs* *184*, 16–22.
- Balda, M.S., and Matter, K. (2000). Transmembrane proteins of tight junctions. *Semin. Cell Dev. Biol.* *11*, 281–289.
- Barr, D.B., Wilder, L.C., Caudill, S.P., Gonzalez, A.J., Needham, L.L., and Pirkle, J.L. (2005). Urinary Creatinine Concentrations in the U.S. Population: Implications for Urinary Biologic Monitoring Measurements. *Environ. Health Perspect.* *113*, 192–200.

- Bauer, H., Stelzhammer, W., Fuchs, R., Weiger, T.M., Danninger, C., Probst, G., and Krizbai, I.A. (1999). Astrocytes and neurons express the tight junction-specific protein occludin in vitro. *Exp. Cell Res.* *250*, 434–438.
- Bleasby, K., Castle, J.C., Roberts, C.J., Cheng, C., Bailey, W.J., Sina, J.F., Kulkarni, A.V., Hafey, M.J., Evers, R., Johnson, J.M., et al. (2006). Expression profiles of 50 xenobiotic transporter genes in humans and pre-clinical species: a resource for investigations into drug disposition. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* *36*, 963–988.
- Boeniger, M.F., Lowry, L.K., and Rosenberg, J. (1993). Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* *54*, 615–627.
- Boogaard, P.J., Mulder, G.J., and Nagelkerke, J.F. (1989a). Isolated proximal tubular cells from rat kidney as an in vitro model for studies on nephrotoxicity. II. Alpha-methylglucose uptake as a sensitive parameter for mechanistic studies of acute toxicity by xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *101*, 144–157.
- Boogaard, P.J., Mulder, G.J., and Nagelkerke, J.F. (1989b). Isolated proximal tubular cells from rat kidney as an in vitro model for studies on nephrotoxicity. II. Alpha-methylglucose uptake as a sensitive parameter for mechanistic studies of acute toxicity by xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *101*, 144–157.
- Boogaard, P.J., Nagelkerke, J.F., and Mulder, G.J. (1990). Renal proximal tubular cells in suspension or in primary culture as in vitro models to study nephrotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* *76*, 251–291.
- Boom, S.P., and Russel, F.G. (1993). Cimetidine uptake and interactions with cationic drugs in freshly isolated proximal tubular cells of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *267*, 1039–1044.
- Boom, S.P., Gribnau, F.W., and Russel, F.G. (1992). Organic cation transport and cationic drug interactions in freshly isolated proximal tubular cells of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *263*, 445–450.
- Bowes, R.C., 3rd, Lightfoot, R.T., Van De Water, B., and Stevens, J.L. (1999). Hepatocyte growth factor induces tubulogenesis of primary renal proximal tubular epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* *180*, 81–90.
- Brown, D., and Stow, J.L. (1996). Protein trafficking and polarity in kidney epithelium: from cell biology to physiology. *Physiol. Rev.* *76*, 245–297.
- Brown, C.D.A., Sayer, R., Windass, A.S., Haslam, I.S., De Broe, M.E., D’Haese, P.C., and Verhulst, A. (2008). Characterisation of human tubular cell monolayers as a model of proximal tubular xenobiotic handling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *233*, 428–438.
- Cha, S.H., Sekine, T., Fukushima, J.I., Kanai, Y., Kobayashi, Y., Goya, T., and Endou, H. (2001). Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol. Pharmacol.* *59*, 1277–1286.
- Chan, B., Lazzaro, V., Seale, J., and Duggin, G. (1996). Characterisation and uptake of paraquat by rat renal proximal tubular cells in primary culture. *Hum. Exp. Toxicol.* *15*, 949–956.
- Charlton, J.A., and Simmons, N.L. (1993). Established human renal cell lines: Phenotypic characteristics define suitability for use in in vitro models for predictive toxicology. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* *7*, 129–136.

- Chen, B., Dodge, M.E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C.-W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N.S., et al. (2009). Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 100–107.
- Cheng, H.-T., Kim, M., Valerius, M.T., Surendran, K., Schuster-Gossler, K., Gossler, A., McMahon, A.P., and Kopan, R. (2007). Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 801–811.
- Cheng, Y., Vapurcuyan, A., Shahidullah, M., Aleksunes, L.M., and Pelis, R.M. (2012). Expression of organic anion transporter 2 in the human kidney and its potential role in the tubular secretion of guanidine-containing antiviral drugs. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *40*, 617–624.
- Chung, S.D., Alavi, N., Livingston, D., Hiller, S., and Taub, M. (1982). Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a hormonally defined medium. *J. Cell Biol.* *95*, 118–126.
- Cihlar, T., Lin, D.C., Pritchard, J.B., Fuller, M.D., Mendel, D.B., and Sweet, D.H. (1999). The antiviral nucleotide analogs cidofovir and adefovir are novel substrates for human and rat renal organic anion transporter 1. *Mol. Pharmacol.* *56*, 570–580.
- Colegio, O.R., Van Itallie, C.M., McCrea, H.J., Rahner, C., and Anderson, J.M. (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *283*, C142–147.
- Courjault-Gautier, J.C. (1995). Consecutive use of hormonally defined serum-free media to establish highly differentiated human renal proximal tubule cells in primary culture. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *5*, 1949–1963.
- Van Crugten, J., Bochner, F., Keal, J., and Somogyi, A. (1986). Selectivity of the cimetidine-induced alterations in the renal handling of organic substrates in humans. Studies with anionic, cationic and zwitterionic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *236*, 481–487.
- Cundy, K.C., Petty, B.G., Flaherty, J., Fisher, P.E., Polis, M.A., Wachsman, M., Lietman, P.S., Lalezari, J.P., Hitchcock, M.J., and Jaffe, H.S. (1995). Clinical pharmacokinetics of cidofovir in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* *39*, 1247–1252.
- Diemert, M.-C., Tricottet, V., Benel, L., Descamps, G., Escolano, E., Galli, J., Reynès, M., and Rousselet, F. (1995). Use of a renal tubule cell line (LLC-PK1) to study the nephrotoxic potential of a kappa-type bence-jones protein. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* *31*, 716–723.
- Dietrich, D.R., O'Brien, E.O., Stack, M.E., and Heussner, A.H. (2001). Species- and sex-specific renal cytotoxicity of Ochratoxin A and B<sub>1</sub> in vitro. *Exp. Toxicol. Pathol.* *53*, 215–225.
- Ee, P.L.R., He, X., Ross, D.D., and Beck, W.T. (2004). Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) gene expression using RNA interference. *Mol. Cancer Ther.* *3*, 1577–1583.
- El-Dahr, S.S., Aboudehen, K., and Saifudeen, Z. (2008). Transcriptional control of terminal nephron differentiation. *AJP Ren. Physiol.* *294*, F1273–F1278.
- Elsby, R., Fox, L., Stresser, D., Layton, M., Butters, C., Sharma, P., Smith, V., and Surry, D. (2011). In vitro risk assessment of AZD9056 perpetrating a transporter-mediated drug-drug interaction with methotrexate. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* *43*, 41–49.

- Enck, A.H., Berger, U.V., and Yu, A.S. (2001). Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281, F966–974.
- Endo, T., Kimura, O., and Sakata, M. (2000). Carrier-mediated uptake of cisplatin by the OK renal epithelial cell line. *Toxicology* 146, 187–195.
- Ernst, F., Hetzel, S., Stracke, S., Czock, D., Vargas, G., P Lutz, M., Keller, F., and Jehle, P.M. (2001). Renal proximal tubular cell growth and differentiation are differentially modulated by renotropic growth factors and tyrosine kinase inhibitors. *Eur. J. Clin. Invest.* 31, 1029–1039.
- European Medicines Agency (2012). Guideline on the Investigation of Drug Interactions (EMA/CHMP/EWP/125211/2010).
- Evans, P.J. (1994). Protein degradation in kidney proximal tubule cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* 1221, 243–249.
- Fanning, A.S., Mitic, L.L., and Anderson, J.M. (1999). Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 10, 1337–1345.
- Fauth, C., Rossier, B., and Roch-Ramel, F. (1988). Transport of tetraethylammonium by a kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *Am. J. Physiol.* 254, F351–357.
- Fishman, A.I., Alexander, B., Eshghi, M., Choudhury, M., and Konno, S. (2012). Nephrotoxin-Induced Renal Cell Injury Involving Biochemical Alterations and Its Prevention With Antioxidant. *J. Clin. Med. Res.* 4, 95–101.
- Fogh, J., Fogh, J.M., and Orfeo, T. (1977). One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59, 221–226.
- Food and Drug Administration (2012). Drug Interaction Studies: Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling.
- Fukushima-Uesaka, H., Maekawa, K., Ozawa, S., Komamura, K., Ueno, K., Shibakawa, M., Kamakura, S., Kitakaze, M., Tomoike, H., Saito, Y., et al. (2004). Fourteen Novel Single Nucleotide Polymorphisms in the SLC22A2 Gene Encoding Human Organic Cation Transporter (OCT2). *Drug Metab. Pharmacokinet.* 19, 239–244.
- Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., and Tsukita, S. (2001). Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J. Cell Biol.* 153, 263–272.
- Gaillard, P.J., and de Boer, A.G. (2000). Relationship between permeability status of the blood–brain barrier and in vitro permeability coefficient of a drug. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 95–102.
- Gallegos, T.F., Martovetsky, G., Kouznetsova, V., Bush, K.T., and Nigam, S.K. (2012). Organic Anion and Cation SLC22 “Drug” Transporter (Oat1, Oat3, and Oct1) Regulation during Development and Maturation of the Kidney Proximal Tubule. *PLoS ONE* 7, e40796.
- Gaush, C.R., Hard, W.L., and Smith, T.F. (1966). Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 122, 931–935.
- Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L., and Haass, C. (2002). A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep.* 3, 688–694.

- Genestie, I., Morin, J.P., Guery, C., Bode, G., and Lorenzon, G. (1997). Morphological and biochemical characterization of primary culture of rabbit proximal kidney tubule cells grown on collagen-IV coated Millicell-CM. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* *33*, 692–702.
- Ghandehari, H., Smith, P.L., Ellens, H., Yeh, P.Y., and Kopecek, J. (1997). Size-dependent permeability of hydrophilic probes across rabbit colonic epithelium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *280*, 747–753.
- Giacomini, K.M., Huang, S.-M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z., Brouwer, K.L.R., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K.M., et al. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* *9*, 215–236.
- Gildea, J.J., Shah, I., Weiss, R., Casscells, N.D., McGrath, H.E., Zhang, J., Jones, J.E., and Felder, R.A. (2010). HK-2 Human Renal Proximal Tubule Cells as a Model for G Protein-Coupled Receptor Kinase Type 4-Mediated Dopamine 1 Receptor Uncoupling. *Hypertension* *56*, 505–511.
- Glube, N., and Langguth, P. (2008). Caki-1 cells as a model system for the interaction of renally secreted drugs with OCT3. *Nephron Physiol.* *108*, p18–28.
- Glube, N., Giessl, A., Wolfrum, U., and Langguth, P. (2007a). Caki-1 Cells Represent an in vitro Model System for Studying the Human Proximal Tubule Epithelium. *Nephron Exp. Nephrol.* *107*, e47–e56.
- Glube, N., Closs, E., and Langguth, P. (2007b). OCTN2-mediated carnitine uptake in a newly discovered human proximal tubule cell line (Caki-1). *Mol. Pharm.* *4*, 160–168.
- Gorboulev, V., Ulzheimer, J.C., Akhoundova, A., Ulzheimer-Teuber, I., Karbach, U., Quester, S., Baumann, C., Lang, F., Busch, A.E., and Koepsell, H. (1997). Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol.* *16*, 871–881.
- Gowder, S.J., and McMartin, K.E. (2010). Development of a Primary Culture System of Rat Kidney Proximal Tubule Cells for Transport Studies. *J. Epithel. Biol. Pharmacol.* *3*, 15–19.
- De Graauw, M., Le Devedec, S., Tijdens, I., Smeets, M.B., Deelder, A.M., and van de Water, B. (2007). Proteomic Analysis of Alternative Protein Tyrosine Phosphorylation in 1,2-Dichlorovinyl-Cysteine-Induced Cytotoxicity in Primary Cultured Rat Renal Proximal Tubular Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *322*, 89–100.
- Guder, W.G., and Ross, B.D. (1984). Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int.* *26*, 101–111.
- Gupta, N., Martin, P.M., Miyauchi, S., Ananth, S., Herdman, A.V., Martindale, R.G., Podolsky, R., and Ganapathy, V. (2006). Down-regulation of BCRP/ABCG2 in colorectal and cervical cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *343*, 571–577.
- Haenen, H., Spenkelink, A., Teunissen, C., Temmink, J.H.M., Koemana, J.H., and Van Bladeren, P.J. (1996). Transport and metabolism of glutathione conjugates of menadione and ethacrynic acid in confluent monolayers of rat renal proximal tubular cells. *Toxicology* *112*, 117–130.
- Hammerman, M.R. (1998). Potential role of growth factors in the prophylaxis and treatment of acute renal failure. *Kidney Int. Suppl.* *64*, S19–22.
- Hammerman, M.R., and Miller, S.B. (1993). The growth hormone insulin-like growth factor axis in kidney revisited. *Am. J. Physiol.* *265*, F1–14.

- Haug, C., Grill, C., Schmid-Kotsas, A., Gruenert, A., and Jehle, P.M. (1998). Endothelin release by rabbit proximal tubule cells: modulatory effects of cyclosporine A, tacrolimus, HGF and EGF. *Kidney Int.* 54, 1626–1636.
- Van der Hauwaert, C., Savary, G., Gnemmi, V., Glowacki, F., Pottier, N., Bouillez, A., Maboudou, P., Zini, L., Leroy, X., Cauffiez, C., et al. (2013). Isolation and Characterization of a Primary Proximal Tubular Epithelial Cell Model from Human Kidney by CD10/CD13 Double Labeling. *PLoS ONE* 8, e66750.
- Helbert, M.J.F., Dauwe, S., and De Broe, M.E. (1999). Flow cytometric immunodissection of the human nephron in vivo and in vitro. *Nephron Exp. Nephrol.* 7, 360–376.
- Hilgendorf, C., Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, A.-L., and Karlsson, J. (2007). Expression of Thirty-six Drug Transporter Genes in Human Intestine, Liver, Kidney, and Organotypic Cell Lines. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1333–1340.
- Hinoshita, E., Uchiumi, T., Taguchi, K., Kinukawa, N., Tsuneyoshi, M., Maehara, Y., Sugimachi, K., and Kuwano, M. (2000). Increased Expression of an ATP-binding Cassette Superfamily Transporter, Multi-drug Resistance Protein 2, in Human Colorectal Carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 6, 2401–2407.
- Hirase, T., Staddon, J.M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., and Rubin, L.L. (1997). Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 14), 1603–1613.
- Hirsch, J.R., Gonska, T., Waldegger, S., Lang, F., and Schlatter, E. (1998). Na(+)-dependent and -independent amino acid transport systems in immortalized human kidney epithelial cells derived from the proximal tubule. *Kidney Blood Press. Res.* 21, 50–58.
- Ho, E.S., Lin, D.C., Mendel, D.B., and Cihlar, T. (2000). Cytotoxicity of antiviral nucleotides adefovir and cidofovir is induced by the expression of human renal organic anion transporter 1. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 11, 383–393.
- Hohage, H., Stachon, A., Feidt, C., Hirsch, J.R., and Schlatter, E. (1998). Regulation of Organic Cation Transport in IHKE-1 and LLC-PK1 Cells. Fluorometric Studies with 4-(4-Dimethylaminostyryl) N-methylpyridinium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 305–310.
- Hori, R., Okamura, M., Takayama, A., Hirozane, K., and Takano, M. (1993). Transport of organic anion in the OK kidney epithelial cell line. *Am. J. Physiol.* 264, F975–980.
- Hou, J., Gomes, A.S., Paul, D.L., and Goodenough, D.A. (2006). Study of Claudin Function by RNA Interference. *J. Biol. Chem.* 281, 36117–36123.
- Huu Duc-Nguyen, Rosenblum, E.N., and Zeigel, R.F. (1966). Persistent infection of a rat kidney cell line with Rauscher murine leukemia virus. *J. Bacteriol.* 92, 1133–1140.
- Igawa, T., Matsumoto, K., Kanda, S., Saito, Y., and Nakamura, T. (1993). Hepatocyte growth factor may function as a renotropic factor for regeneration in rats with acute renal injury. *Am. J. Physiol.* 265, F61–69.
- Imamdi, R. (2004). Protein Kinase C Mediates Cisplatin-Induced Loss of Adherens Junctions Followed by Apoptosis of Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 892–903.
- Indiveri, C., Galluccio, M., Scalise, M., and Pochini, L. (2013). Strategies of bacterial over expression of membrane transporters relevant in human health: the successful case of the three members of OCTN subfamily. *Mol. Biotechnol.* 54, 724–736.

Islinger, F., Gekle, M., and Wright, S.H. (2001). Interaction of 2,3-dimercapto-1-propane sulfonate with the human organic anion transporter hOAT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 741–747.

Van Itallie, C.M., Holmes, J., Bridges, A., Gookin, J.L., Coccaro, M.R., Proctor, W., Colegio, O.R., and Anderson, J.M. (2008). The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J. Cell Sci.* 121, 298–305.

Iwai, M., Minematsu, T., Li, Q., Iwatsubo, T., and Usui, T. (2011). Utility of P-glycoprotein and organic cation transporter 1 double-transfected LLC-PK1 cells for studying the interaction of YM155 monobromide, novel small-molecule survivin suppressant, with P-glycoprotein. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 39, 2314–2320.

Jakoby, W.B. (1981). *Detoxication and drug metabolism: conjugation and related systems* (New York: Academic Press).

Jans, F., Vandenabeele, F., Helbert, M., Lambrichts, I., Ameloot, M., and Steels, P. (2000). 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. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 440, 643–651.

Jehle, P.M., Fussgänger, R.D., Stracke, S., Grunewald, R.W., and Keller, F. (1996). Different binding and degradation of proinsulin, insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in cultured renal proximal tubular cells. Implications for the prolonged serum half-life of proinsulin. *Acta Diabetol.* 33, 159–165.

Jenkinson, S.E., Chung, G.W., Loon, E. van, Bakar, N.S., Dalzell, A.M., and Brown, C.D.A. (2012). The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 464, 601–611.

Jennings, P., Koppelstätter, C., Lechner, J., and Pfaller, W. (2008). Renal cell culture models: Contribution to the understanding of nephrotoxic mechanisms. In *Clinical Nephrotoxins*, (Springer), pp. 223–249.

Jiang, J., Dean, D., Burghardt, R.C., and Parrish, A.R. (2004). Disruption of cadherin/catenin expression, localization, and interactions during HgCl<sub>2</sub>-induced nephrotoxicity. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 80, 170–182.

Jones, D.P., Sundby, G.-B., Ormstad, K., and Orrenius, S. (1979). Use of isolated kidney cells for study of drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 28, 929–935.

Jong, N.N., Nakanishi, T., Liu, J.J., Tamai, I., and McKeage, M.J. (2011). Oxaliplatin Transport Mediated by Organic Cation/Carnitine Transporters OCTN1 and OCTN2 in Overexpressing Human Embryonic Kidney 293 Cells and Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338, 537–547.

Jung, J.C., Lee, S.M., Kadakia, N., and Taub, M. (1992). Growth and function of primary rabbit kidney proximal tubule cells in glucose-free serum-free medium. *J. Cell. Physiol.* 150, 243–250.

Kemmer, I. (2005). *Differentielle Expression von Claudinen entlang des menschlichen Nephrons und in epithelialen Nierenzelltumoren [Elektronische Ressource] / vorgelegt von Inken Kemmer. Online-Ressource.*

Khamdang, S., Takeda, M., Noshiro, R., Narikawa, S., Enomoto, A., Anzai, N., Piyachaturawat, P., and Endou, H. (2002). Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 534–539.

- Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y., and Tsukita, S. (2002). Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J. Am. Soc. Nephrol.* *13*, 875–886.
- Klinke, R., Baumann, Rosemarie (2010). *Physiologie* (Stuttgart [u.a.: Thieme).
- Knipp, G.T., Ho, N.F., Barsuhn, C.L., and Borchardt, R.T. (1997). Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. *J. Pharm. Sci.* *86*, 1105–1110.
- König, J., Zolk, O., Singer, K., Hoffmann, C., and Fromm, M.F. (2011). Double-transfected MDCK cells expressing human OCT1/MATE1 or OCT2/MATE1: determinants of uptake and transcellular translocation of organic cations. *Br. J. Pharmacol.* *163*, 546–555.
- Kopan, R., Cheng, H.-T., and Surendran, K. (2007). Molecular insights into segmentation along the proximal-distal axis of the nephron. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *18*, 2014–2020.
- Kuo, K.-L., Zhu, H., McNamara, P.J., and Leggas, M. (2012). Localization and Functional Characterization of the Rat Oatp4c1 Transporter in an In Vitro Cell System and Rat Tissues. *PLoS ONE* *7*, e39641.
- De Larco, J.E., and Todaro, G.J. (1978). Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J. Cell. Physiol.* *94*, 335–342.
- Lash, L.H. (2001). Measurement of glutathione transport. *Curr. Protoc. Toxicol.* 6–3.
- Lash, L.H., and Tokarz, J.J. (1989). Isolation of two distinct populations of cells from rat kidney cortex and their use in the study of chemical-induced toxicity. *Anal. Biochem.* *182*, 271–279.
- Lash, L.H., Tokarz, J.J., and Pegouske, D.M. (1995). Susceptibility of primary cultures of proximal tubular and distal tubular cells from rat kidney to chemically induced toxicity. *Toxicology* *103*, 85–103.
- Lash, L.H., Putt, D.A., Hueni, S.E., Cao, W., Xu, F., Kulidjian, S.J., and Horwitz, J.P. (2002). Cellular energetics and glutathione status in NRK-52E cells: toxicological implications. *Biochem. Pharmacol.* *64*, 1533–1546.
- Lash, L.H., Putt, D.A., Xu, F., and Matherly, L.H. (2007). Role of rat organic anion transporter 3 (Oat3) in the renal basolateral transport of glutathione. *Chem. Biol. Interact.* *170*, 124–134.
- Lee, W., and Kim, R.B. (2004). Transporters and renal drug elimination. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *44*, 137–166.
- Lehr, C.-M. (2003). *Cell Culture Models of Biological Barriers: In vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery* (CRC Press).
- Lepist, E.-I., and Ray, A.S. (2012). Renal drug-drug interactions: what we have learned and where we are going. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *8*, 433–448.
- Li, M., Anderson, G.D., and Wang, J. (2006). Drug–drug interactions involving membrane transporters in the human kidney. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *2*, 505–532.
- Li, W.Y., Huey, C.L., and Yu, A.S.L. (2004). Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* *286*, F1063–F1071.

- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- Lu, J., Ma, Z., Hsieh, J.-C., Fan, C.-W., Chen, B., Longgood, J.C., Williams, N.S., Amatruda, J.F., Lum, L., and Chen, C. (2009). Structure/Activity Relationship Studies of Small-Molecule Inhibitors of Wnt Response. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 3825–3827.
- Luhe, A. (2003). A New Approach to Studying Ochratoxin A (OTA)-Induced Nephrotoxicity: Expression Profiling in Vivo and in Vitro Employing cDNA Microarrays. *Toxicol. Sci.* 73, 315–328.
- Lutz, K.L., and Siahaan, T.J. (1997). Molecular structure of the apical junction complex and its contribution to the paracellular barrier. *J. Pharm. Sci.* 86, 977–984.
- Meier-Abt, P.J. (2002). Cellular drug and xenobiotic uptake. *Kidney Int.* 62, 1521–1522.
- Miller, D.S. (2010). Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood–brain barrier. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 246–254.
- Minematsu, T., Iwai, M., Umehara, K.-I., Usui, T., and Kamimura, H. (2010). Characterization of human organic cation transporter 1 (OCT1/SLC22A1)- and OCT2 (SLC22A2)-mediated transport of 1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(pyrazin-2-ylmethyl)-4,9-dihydro-1H-naphtho[2,3-d]imidazolium bromide (YM155 monobromide), a novel small molecule survivin suppressant. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 38, 1–4.
- Mitsuoka, K., Shirasaka, Y., Fukushi, A., Sato, M., Nakamura, T., Nakanishi, T., and Tamai, I. (2009). Transport characteristics of L-citrulline in renal apical membrane of proximal tubular cells. *Biopharm. Drug Dispos.* 30, 126–137.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 511–516.
- Morita, N., Kusuhara, H., Sekine, T., Endou, H., and Sugiyama, Y. (2001). Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1179–1184.
- Morrissey, K.M., Stocker, S.L., Wittwer, M.B., Xu, L., and Giacomini, K.M. (2013). Renal Transporters in Drug Development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 503–529.
- Nishimura, M., and Naito, S. (2005). Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 20, 452–477.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 161, 653–660.
- Nouwen, E.J., Dauwe, S., van der Biest, I., and De Broe, M.E. (1993). Stage- and segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM, and L-CAM in the kidney. *Kidney Int.* 44, 147–158.
- Okuda, M., Urakami, Y., Saito, H., and Inui, K. (1999). Molecular mechanisms of organic cation transport in OCT2-expressing *Xenopus* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1417, 224–231.
- Perri, D., Ito, S., Rowsell, V., and Shear, N.H. (2003). The kidney--the body's playground for drugs: an overview of renal drug handling with selected clinical correlates. *Can. J. Clin. Pharmacol. J. Can. Pharmacol. Clin.* 10, 17–23.

- Pinchot, S.N., Jaskula-Sztul, R., Ning, L., Peters, N.R., Cook, M.R., Kunnimalaiyaan, M., and Chen, H. (2011). Identification and validation of Notch pathway activating compounds through a novel high-throughput screening method. *Cancer* 117, 1386–1398.
- Price, K.L., Hulton, S.-A., van't Hoff, W.G., Masters, J.R., and Rumsby, G. (2009). Primary cultures of renal proximal tubule cells derived from individuals with primary hyperoxaluria. *Urol. Res.* 37, 127–132.
- Prozialeck, W.C., Lamar, P.C., and Appelt, D.M. (2004). Differential expression of E-cadherin, N-cadherin and beta-catenin in proximal and distal segments of the rat nephron. *BMC Physiol.* 4, 10.
- Prozialeck, W.C., Edwards, J.R., Lamar, P.C., and Smith, C.S. (2006). Epithelial barrier characteristics and expression of cell adhesion molecules in proximal tubule-derived cell lines commonly used for in vitro toxicity studies. *Toxicol. In Vitro* 20, 942–953.
- Pulkkinen, K., Murugan, S., and Vainio, S. (2008). Wnt signaling in kidney development and disease. *Organogenesis* 4, 55–59.
- Qi, W., Johnson, D.W., Vesey, D.A., Pollock, C.A., and Chen, X. (2007). Isolation, propagation and characterization of primary tubule cell culture from human kidney (Methods in Renal Research). *Nephrology* 12, 155–159.
- Quan, Y., Jin, Y., Faria, T.N., Tilford, C.A., He, A., Wall, D.A., Smith, R.L., and Vig, B.S. (2012). Expression Profile of Drug and Nutrient Absorption Related Genes in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cells Grown under Differentiation Conditions. *Pharmaceutics* 4, 314–333.
- Rahmoune, H., Thompson, P.W., Ward, J.M., Smith, C.D., Hong, G., and Brown, J. (2005). Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 54, 3427–3434.
- Redinbaugh, M.G., and Turley, R.B. (1986). Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal. Biochem.* 153, 267–271.
- Reidy, K.J., and Rosenblum, N.D. (2009). Cell and molecular biology of kidney development. *Semin. Nephrol.* 29, 321–337.
- Reubi, F.C. (1953). Glomerular filtration rate, renal blood flow and blood viscosity during and after diabetic coma. *Circ. Res.* 1, 410–413.
- Reyes, J.L., Lamas, M., Martin, D., del Carmen Namorado, M., Islas, S., Luna, J., Tauc, M., and González-Mariscal, L. (2002). The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int.* 62, 476–487.
- Romero-Calvo, I., Ocón, B., Martínez-Moya, P., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., and de Medina, F.S. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* 401, 318–320.
- Rothenbacher, K.P., Kimmel, R., Hildenbrand, S., Schmahl, F.W., and Dartsch, P.C. (1998). Nephrotoxic effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) hydrolysis products on cultured kidney epithelial cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 17, 336–342.
- Schaaf, G.J., de Groene, E.M., Maas, R.F., Commandeur, J.N., and Fink-Gremmels, J. (2001). Characterization of biotransformation enzyme activities in primary rat proximal tubular cells. *Chem. Biol. Interact.* 134, 167–190.

- Schaaf, G.J., Maas, R.F.M., and Fink-Gremmels, J. (2004). Biotransformation Studies Using Rat Proximal Tubule Cells. *Curr. Protoc. Toxicol.* 4–14.
- Schneeberger, E.E., and Lynch, R.D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286, C1213–1228.
- Schwarz, C., Hauser, P., Steininger, R., Regele, H., Heinze, G., Mayer, G., and Oberbauer, R. (2002). Failure of BCL-2 up-regulation in proximal tubular epithelial cells of donor kidney biopsy specimens is associated with apoptosis and delayed graft function. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 82, 941–948.
- Shiga, T., Hashiguchi, M., Urae, A., Kasanuki, H., and Rikihisa, T. (2000). Effect of cimetidine and probenecid on pilsicainide renal clearance in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67, 222–228.
- Sikka, P.K., and McMartin, K.E. (1996). Normal rat kidney proximal tubule cells in primary and multiple subcultures. *Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.* 32, 285–291.
- Silber, P.M., Gandolfi, A.J., and Brendel, K. (1986). Adaptation of a  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase assay to microtiter plates. *Anal. Biochem.* 158, 68–71.
- Slitt, A.L., Cherrington, N.J., Hartley, D.P., Leazer, T.M., and Klaassen, C.D. (2002). Tissue distribution and renal developmental changes in rat organic cation transporter mRNA levels. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 30, 212–219.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Somogyi, A., McLean, A., and Heinzow, B. (1983). Cimetidine-procainamide pharmacokinetic interaction in man: evidence of competition for tubular secretion of basic drugs. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 25, 339–345.
- Somogyi, A., Stockley, C., Keal, J., Rolan, P., and Bochner, F. (1987). Reduction of metformin renal tubular secretion by cimetidine in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 23, 545–551.
- Spears, K.J., Ross, J., Stenhouse, A., Ward, C.J., Goh, L.-B., Wolf, C.R., Morgan, P., Ayrton, A., and Friedberg, T.H. (2005). Directional trans-epithelial transport of organic anions in porcine LLC-PK1 cells that co-express human OATP1B1 (OATP-C) and MRP2. *Biochem. Pharmacol.* 69, 415–423.
- Stanton, R.C., Mendrick, D.L., Rennke, H.G., and Seifter, J.L. (1986). Use of monoclonal antibodies to culture rat proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 251, C780–786.
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., and McMahon, A.P. (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372, 679–683.
- Steinmassl, D., Pfaller, W., Gstraunthaler, G., and Hoffmann, W. (1995). LLC-PK1 epithelia as a model for in vitro assessment of proximal tubular nephrotoxicity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 31, 94–106.
- Taal, M.W., Brenner, B.M., and Rector (2012). *Brenner & Rector's the kidney* (Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders).
- Takeda, M., Narikawa, S., Hosoyamada, M., Cha, S.H., Sekine, T., and Endou, H. (2001). Characterization of organic anion transport inhibitors using cells stably expressing human organic anion transporters. *Eur. J. Pharmacol.* 419, 113–120.

- Takeda, M., Khamdang, S., Narikawa, S., Kimura, H., Kobayashi, Y., Yamamoto, T., Cha, S.H., Sekine, T., and Endou, H. (2002). Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *300*, 918–924.
- Takenaka, M., Imai, E., Kaneko, T., Ito, T., Moriyama, T., Yamauchi, A., Hori, M., Kawamoto, S., and Okubo, K. (1998). Isolation of genes identified in mouse renal proximal tubule by comparing different gene expression profiles. *Kidney Int.* *53*, 562–572.
- Tanihara, Y., Masuda, S., Sato, T., Katsura, T., Ogawa, O., and Inui, K.-I. (2007). Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. *Biochem. Pharmacol.* *74*, 359–371.
- Taub, M.L., Yang, I.S., and Wang, Y. (1989). Primary rabbit kidney proximal tubule cell cultures maintain differentiated functions when cultured in a hormonally defined serum-free medium. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* *25*, 770–775.
- Terada, T., Saito, H., Mukai, M., and Inui, K. (1997). Recognition of beta-lactam antibiotics by rat peptide transporters, PEPT1 and PEPT2, in LLC-PK1 cells. *Am. J. Physiol.* *273*, F706–F711.
- Terlouw, S.A., Masereeuw, R., van den Broek, P.H., Notenboom, S., and Russel, F.G. (2001). Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in glutathione-bimane efflux from Caco-2 and rat renal proximal tubule cells. *Br. J. Pharmacol.* *134*, 931–938.
- Terryn, S., Jouret, F., Vandenabeele, F., Smolders, I., Moreels, M., Devuyst, O., Steels, P., and Kerkhove, E.V. (2007). A primary culture of mouse proximal tubular cells, established on collagen-coated membranes. *AJP Ren. Physiol.* *293*, F476–F485.
- Toutain, H., Courjault, F., Vauclin-Jacques, N., and Morin, J.P. (1990). Adenylate cyclase responses and biochemical characterization of primary rabbit proximal tubular cell cultures and LLC-PK1 cells. *Ren. Fail.* *12*, 177–182.
- Toutain, H., Vauclin-Jacques, N., Fillastre, J.-P., and Morin, J.-P. (1991). Biochemical, functional, and morphological characterization of a primary culture of rabbit proximal tubule cells. *Exp. Cell Res.* *194*, 9–18.
- Tsuda, M., Terada, T., Ueba, M., Sato, T., Masuda, S., Katsura, T., and Inui, K. (2009). Involvement of Human Multidrug and Toxin Extrusion 1 in the Drug Interaction between Cimetidine and Metformin in Renal Epithelial Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *329*, 185–191.
- Turksen, K., and Troy, T.-C. (2004). Barriers built on claudins. *J. Cell Sci.* *117*, 2435–2447.
- Tveito, G., Hansteen, I.-L., Dalen, H., and Haugen, A. (1989). Immortalization of normal human kidney epithelial cells by nickel (II). *Cancer Res.* *49*, 1829–1835.
- Ueo, H., Motohashi, H., Katsura, T., and Inui, K. (2005). Human organic anion transporter hOAT3 is a potent transporter of cephalosporin antibiotics, in comparison with hOAT1. *Biochem. Pharmacol.* *70*, 1104–1113.
- Urakami, Y., Okuda, M., Saito, H., and Inui, K. (2000). Hormonal regulation of organic cation transporter OCT2 expression in rat kidney. *FEBS Lett.* *473*, 173–176.
- Vargas, G.A., Hoeflich, A., and Jehle, P.M. (2000). Hepatocyte growth factor in renal failure: promise and reality. *Kidney Int.* *57*, 1426–1436.

- Wang, L., Wang, H., Hu, M., Cao, J., Chen, D., and Liu, Z. (2009). Oxidative stress and apoptotic changes in primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to lead. *Arch. Toxicol.* *83*, 417–427.
- Van de Water, B., Nagelkerke, J.F., and Stevens, J.L. (1999). Dephosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and loss of focal contacts precede caspase-mediated cleavage of FAK during apoptosis in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 13328–13337.
- Van de Water, F.M., Boleij, J.M., Peters, J.G.P., Russel, F.G.M., and Masereeuw, R. (2007). Characterization of P-glycoprotein and multidrug resistance proteins in rat kidney and intestinal cell lines. *Eur. J. Pharm. Sci.* *30*, 36–44.
- Watson, C.J., Rowland, M., and Warhurst, G. (2001). Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *281*, C388–397.
- Weiland, C., Ahr, H.J., Vohr, H.W., and Ellinger-Ziegelbauer, H. (2007). Characterization of primary rat proximal tubular cells by gene expression analysis. *Toxicol. In Vitro* *21*, 466–491.
- Wermuth, C.G. (2011). *The Practice of Medicinal Chemistry* (Academic Press).
- Wilmer, M.J.G., de Graaf-Hess, A., Blom, H.J., Dijkman, H.B.P.M., Monnens, L.A., van den Heuvel, L.P., and Levtchenko, E.N. (2005). Elevated oxidized glutathione in cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *337*, 610–614.
- Wilson, P.D., Dillingham, M.A., Breckon, R., and Anderson, R.J. (1985). Defined human renal tubular epithelia in culture: growth, characterization, and hormonal response. *Am. J. Physiol.* *248*, F436–443.
- Winter, C.H. (2006). Taurocholat-Transport in isolierten proximalen Tubuluszellen der Ratte : Einfluss einer extrahepatischen Cholestase.
- Wright, S.H. (2004). Molecular and Cellular Physiology of Renal Organic Cation and Anion Transport. *Physiol. Rev.* *84*, 987–1049.
- Yoo, J.-W., Kim, Y.-S., Lee, S.-H., Lee, M.-K., Roh, H.-J., Jhun, B.-H., Lee, C.-H., and Kim, D.-D. (2003). Serially passaged human nasal epithelial cell monolayer for in vitro drug transport studies. *Pharm. Res.* *20*, 1690–1696.
- Zolk, O., Solbach, T.F., König, J., and Fromm, M.F. (2009). Functional Characterization of the Human Organic Cation Transporter 2 Variant p.270Ala>Ser. *Drug Metab. Dispos.* *37*, 1312–1318.