

Primaire cultuur van proximale tubuluscellen van de muis

cytosolaire calcium in functie van hormoonstimulatie

Mieke TIMMERS

promotor :

Prof. dr. Emmy VAN KERKHOVE

INHOUDSOPGAVE

LIJST MET AFKORTINGEN	iii
DANKWOORD	iv
SAMENVATTING	v
INLEIDING	1
1 Algemeen	1
1.1 Functie van de nier	1
1.2 Opbouw van de nier	1
1.3 Functie van de proximale tubulus	2
1.4 De intracellulaire Ca^{2+} -homeostase	3
2 Ca^{2+} -transportsystemen in de proximale tubulus	3
2.1 Ca^{2+} -kanalen	3
2.2 De Na^+/Ca^{2+} -uitwisselaar	4
2.3 Het Ca^{2+} -ATPase	5
3 Intracellulaire Ca^{2+} -bindingsproteïnen	6
4 Het endoplasmatische reticulum (ER)	6
4.1 SERCA-pompen	6
4.2 ER-buffermoleculen	7
4.3 Ca^{2+} -release kanalen	7
5 Mitochondriën	7
5.1 Mitochondriën zouden snel mobiliseerbare Ca^{2+} -opslagplaatsen zijn	8
5.2 Mitochondriën zouden relatief inactieve organellen zijn in de cellulaire Ca^{2+} -homeostase	8
5.3 Mitochondriën zouden fungeren als sinks	8
6 Andere intracellulaire Ca^{2+} -opslagplaatsen	9
7 Effecten van hormonen die ageren via Ca^{2+} als <i>second messenger</i>	9
7.1 Bradykinine	9
7.2 Angiotensine II	11
8 Regulatie van $[Ca^{2+}]_i$	14
9 Cadmium: Opname door proximale tubuluscellen en zijn toxische effecten	15
9.1 Opname van Cd in proximale tubuluscellen	16
9.2 Transport van geïoniseerd Cd	16
9.3 Transport van gebonden Cd	16
9.4 Secretie van Cd van proximale tubuluscellen	17
9.5 Mechanismen van Cd-toxiciteit in proximale tubuluscellen	17
10 Gevolgen van gestegen intracellulaire Ca^{2+} -concentratie	19
11 Doelstellingen van het onderzoek	20
MATERIALEN & METHODEN	21
12 Primaire cultuur van proximale tubuluscellen van de muis	21
12.1 Materialen	21
12.2 Methode	23

13	<u>γ-glutamyltransferase assay</u>	24
13.1	<i>Materialen</i>	25
13.2	<i>Methode</i>	27
14	<u>Fluorescentiemicroscopie</u>	27
14.1	<i>Algemene procedure</i>	27
14.2	<i>Metingen van intracellulaire calciumconcentraties</i>	29
14.3	<i>Oplossingen en reagentia</i>	30
<u>RESULTATEN</u>		32
15	<u>Primaire cultuur van proximale tubuluscellen van de muis</u>	32
16	<u>γ-glutamyltransferase assay</u>	33
17	<u>Fluorescentiemicroscopie</u>	34
17.1	<i>Basale $[Ca^{2+}]_i$ in primaire culturen versus vers geïsoleerde proximale tubuli</i>	35
17.2	<i>$[Ca^{2+}]_i$ in functie van hormoonstimulatie</i>	35
17.3	<i>Vergelijking tussen primaire culturen en vers geïsoleerde proximale tubuli</i>	39
17.4	<i>Effect van Cd op de intracellulaire Ca^{2+}-homeostase</i>	40
<u>DISCUSSIE</u>		41
18	<u>Primaire cultuur van proximale tubuluscellen van de muis</u>	41
19	<u>γ-glutamyltransferase assay</u>	42
20	<u>Fluorescentiemicroscopie</u>	43
20.1	<i>Primaire culturen versus vers geïsoleerde proximale tubuli</i>	43
20.2	<i>Basale $[Ca^{2+}]_i$ in primaire culturen versus vers geïsoleerde proximale tubuli</i>	43
20.3	<i>$[Ca^{2+}]_i$ in functie van hormoonstimulatie</i>	43
20.4	<i>Effect van Cd op de intracellulaire Ca^{2+}-homeostase</i>	46
21	<u>Algemene conclusie</u>	47
<u>REFERENTIES</u>		48

LIJST MET AFKORTINGEN

[Ca ²⁺] _i	intracellulaire calciumconcentratie
[Ca ²⁺] _m	mitochondriale calciumconcentratie
5,6-EET	<i>5,6-epoxyeicosatrienoic acid</i>
γ-GT	γ-glutamyltransferase
AA	<i>arachidonic acid</i>
AC	adenylaat cyclase
ACE	angiotensine converterend enzyme
AngII	AngiotensineII
AT	angiotensinereceptor
AZ	aminozuren
BI	basolaterale invouwingen
BB	<i>brush border</i>
BK	bradykinine
cADPR	<i>cyclic ADP-ribose</i>
CM	cultuurmedium
DAG	diacylglycerol
DO	dissectie-oplossing
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ER	endoplasmatisch reticulum
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GPCR	G-proteïne gekoppelde receptor
GSH	gluthatione
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
IP ₃	inositol 1,4,5-trisfosfaat
ITS-supplement	<i>insulin-transferrin-selenite-media</i> supplement
LPS	lipopolysaccharide
MCU	mitochondriale Ca ²⁺ -uniporter
MT	metallothioneïne
MV	microvilli
NAADP	<i>nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate</i>
NCX1	Na ⁺ /Ca ²⁺ -exchanger 1
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfaat
PKA	proteïne kinase A
PKC	proteïne kinase C
PLA ₂	<i>phospholipase A₂</i>
PLC	<i>phospholipase C</i>
PMCA	<i>plasmamembrane Ca²⁺-ATPase</i>
PT	proximale tubulus
PTFE-gecoate filter	polytetrafluoroethyleen-gecoate filter
RAS	renine-angiotensine systeem
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SEM	standard error of mean
SERCA	sarcoplasmatisch/endoplasmatisch reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SOC	<i>store-operated channel</i>
SBTI	<i>soyabean trypsin inhibitor</i>
TEM	transmissie elektronenmicroscopie
TJ	<i>tight junctions</i>

DANKWOORD

Nu ik de laatste lettertjes van deze thesis intoets, dringt het pas écht tot mij door dat het studentenleven er bijna op zit. Het waren vier jaren van hard werken, maar de voldoening die je krijgt als het harde werken wordt beloond, is enorm. Zonder de hulp van anderen zou ik nu niet aan het einde van mijn studie staan. Bedankt aan iedereen die hieraan heeft bijgedragen.

Ook deze thesis zou nooit het levenslicht hebben gezien, moest ik er alleen hebben voorgestaan. Gelukkig kon ik rekenen op een fantastische groep van mensen die allen een woordje van dank verdienen.

Allereerst wil ik mijn promotor Prof. Dr. E. Van Kerkhove danken voor de nuttige suggesties en voor de tijd die ze heeft vrijgemaakt voor het nalezen en verbeteren van deze thesis.

Prof. Dr. P. Steels dank ik voor het kritisch nalezen en beoordelen van mijn scriptie.

Mijn begeleidster Sara Terryn was er niet altijd in ‘levende lijve’, maar ik mocht haar steeds overrompelen met mailtjes. De keren dat ze langs het labo passeerde, betekenden zeer veel voor mij. Ze stond altijd klaar met advies en zonodig met bemoedigende woorden. Bedankt!

Wanneer de microscoop het liet afweten of bij eender welk ander probleempje stond Martin van de Ven altijd paraat. Bedankt voor de bereidwilligheid om me iedere keer te helpen wanneer ik voor de zoveelste keer aan je bureau stond.

Koen Jolling en Jo Janssen voor de gezellige wandelingen naar de muisjes en voor de ‘opbeurende’ humor wanneer het allemaal wat moeizamer ging.

Ook dankuwel aan Rosette Beenaerts voor het maken van de oplossingen.

Ik ben ook alle mensen van de onderzoeksgroep fysiologie erg dankbaar. De lachende en vriendelijke gezichten en de helpende handen wanneer het dreigde mis te lopen, maakten er een plekje van waar ik mij thuis voelde. Velen vroegen mij of het een beetje lukte. Ook al wilden de cellen of de microscoop niet meewerken, deze blijk van interesse gaf mij de moed om telkens door te zetten.

Omdat een stageperiode uit meer bestaat dan experimenteren in het labo en het doorzwoegen van artikels ben ik mijn medestudentjes erg dankbaar voor de ontspannende momenten. De vele lachbuien en de bereidheid om te helpen met wat dan ook maakten dat er een toffe sfeer heerste in ons bureautje. Debby, Kim, Ann en Nick, jullie waren geweldig!

Tenslotte wil ik mijn ouders danken voor het mogelijk maken van mijn studie en voor de steun en het vertrouwen die ze mij tot op het einde schonken.

SAMENVATTING

Calcium (Ca^{2+}) vervult als universeel signaalmolecule een belangrijke rol in talrijke cellulaire processen. Hiervoor is het noodzakelijk dat de intracellulaire Ca^{2+} -concentratie ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) strikt gereguleerd wordt. Veel hormonen oefenen hun effect uit door de concentratie van dit belangrijke ion te beïnvloeden. In de proximale tubulus van de nier werken de hormonen bradykinine (BK) en angiotensine II (AngII) via een intracellulaire Ca^{2+} -stijging.

Eerder onderzoek heeft geleid tot de ontwikkeling van primaire culturen waarbij proximale tubuluscellen van de muis gegroeid worden op membranen. Met licht- en elektronenmicroscopie werden de culturen morfologisch gekarakteriseerd. Dit onthulde een kasseisteenachtige monolaag van gepolariseerde cellen. De aanwezigheid van typische epitheliale kenmerken zoals apicale microvilli, talrijke organellen, tight junctions aan de apicale pool en basolaterale invouwingen, werd geobserveerd.

In deze studie werden de primaire culturen eerst functioneel gekarakteriseerd. De aanwezigheid van het brushborder enzyme, γ -glutamyltransferase, een merker van proximale tubuluscellen, werd getest om de identiteit van de cellen te achterhalen. Vervolgens werd in confluente culturen de intracellulaire Ca^{2+} -homeostase bepaald met behulp van microfluorescentietechnieken en werden veranderingen in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ geregistreerd met de Ca^{2+} -gevoelige fluorescente probe, Fura-2/AM. De metingen werden uitgevoerd zowel in basale omstandigheden als na stimulatie met BK en AngII. Ook het effect van cadmium (Cd) op de intracellulaire Ca^{2+} -homeostase werd bestudeerd door de primaire culturen gedurende 24 uur bloot te stellen aan 100 nM of 1 μM CdCl_2 . De basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -niveaus en de hormonale responsen werden vergeleken tussen twee in vitro systemen, de primaire culturen en vers geïsoleerde proximale tubuli.

De resultaten toonden dat de basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in vers geïsoleerde proximale tubuli significant hoger was dan in de primaire culturen. Stimulatie met BK resulteerde in een snelle, transiënte stijging in Ca^{2+} , gevolgd door een tragere stijging die maximaal was na stimulatie met 1 nM BK. Blootstelling aan AngII (0,1 μM en 1 μM) veroorzaakte een trage stijging in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. De hormonale responsen in de primaire culturen en vers geïsoleerde proximale tubuli waren niet significant verschillend. Preliminair experimenten met Cd (1 μM) toonden een daling in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ van 33%. Verdere studies zijn nodig om dit te onderzoeken.

Deze studie toont dat de primaire culturen van proximale tubuluscellen van de muis functioneel gekarakteriseerd worden door de aanwezigheid van AngII- en BK-receptoren, zoals in vivo.

1 Algemeen

De nier is een belangrijk orgaan in de homeostase van lichaamsvloeistoffen waarbij vooral de proximale tubulus fungeert als hét werkpaard. Verschillende aspecten van de werking worden geregeld door hormonale factoren waarvan sommige ageren via calcium (Ca^{2+}). Naast de hormonale invloeden is de proximale tubulus ook het primaire doelwit voor de toxische effecten van cadmium (Cd) (1, 2).

Tijdens mijn stageperiode worden proximale tubuluscellen van de muis in cultuur gebracht. Om de Ca^{2+} -homeostase van de culturen te karakteriseren, wordt de intracellulaire vrije Ca^{2+} -concentratie ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in controle-omstandigheden bepaald om vervolgens na te gaan of de verwachte respons op hormonen aanwezig is. Pilootexperimenten met Cd worden uitgevoerd om het effect van Cd op de intracellulaire Ca^{2+} -homeostase te bestuderen.

In deze inleiding zullen de mechanismen die aanwezig zijn en mogelijk een rol spelen in het onderhouden van $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aan bod komen. De hormonen die werken via Ca^{2+} worden van naderbij bekeken, alsook de hypothesen in verband met de werkingsmechanismen van Cd.

1.1 Functie van de nier

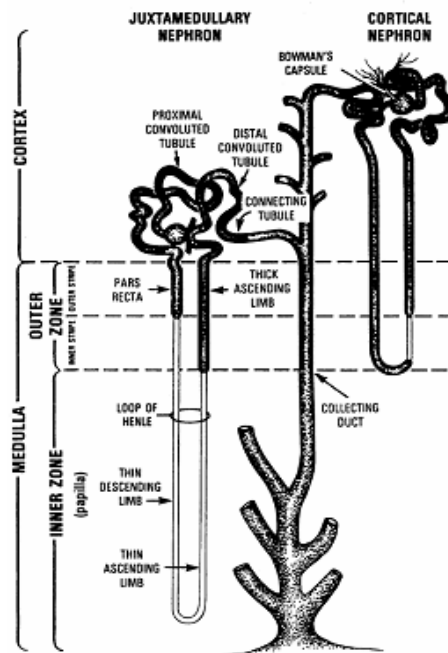
Nieren zijn gepaarde, boonvormige organen die zich aan weerszijden van de wervelkolom, tegen de achterzijde van de buikholte bevinden. Ze vervullen een aantal belangrijke functies in ons lichaam. Eén daarvan is de excretie van afvalproducten door de vorming van urine. Ook zijn ze verantwoordelijk voor de homeostase van lichaamsvloeistoffen. Dit realiseren ze door het vloeistofvolume, de elektrolyten- en de zuur-base-balans te reguleren. Als laatste essentiële functie produceren de nieren hormonen zoals erythropoëtine, renine en vitamine D (2).

1.2 Opbouw van de nier

De nier kan ruwweg onderverdeeld worden in twee gebieden: de nierschors (cortex) en het niermerg (medulla). De nefronen, waarvan er zich een miljoental bevinden in iedere nier, zijn de functionele eenheden en strekken zich uit doorheen de cortex en de medulla (fig.1).

Een nefron begint in de cortex met een nierlichaampje (lichaampje van Malpighi), bestaande uit een bekervormige structuur (het kapsel van Bowman), rond een kluwen van bloedvaten (de glomerulus). De glomerulus gedraagt zich als een filter van het aangevoerde bloed. Het

ultrafiltraat, ook de primaire urine genoemd, wordt opgevangen in het kapsel van Bowman, dat het doorgeeft aan het complexe systeem van de niertubulus (2).



Figuur 1: Structuur van juxtamedullaire nefronen (15%) met de glomerulus gelegen in de binnenste cortex nabij de medulla, en corticale nefronen (85%) waarbij de glomerulus zich in de buitenste cortex bevindt (2).

De proximale tubulus kan, gebaseerd op de ultrastructuur, ingedeeld worden in drie segmenten: S1, S2 en S3. Van hieruit stroomt het filtraat achtereenvolgens in de lis van henle (afdalend deel, dun en dik opstijgend deel), de distale tubulus en via een kort verbindingsstuk in de verzamelbuis (fig. 1). Verzamelbuizen van verschillende nefronen komen samen en convergeren tot een ductus papillaris. De urine komt via de kleine en grote nierkelken vervolgens terecht in het nierbekken, dat uitmondt in de ureter (2). In deze studie zullen we ons toeleggen op de proximale tubuli.

1.3 Functie van de proximale tubulus

Het primaire filtraat wordt tijdens het transport in het tubulaire systeem zowel sterk veranderd in samenstelling als gereduceerd in volume. Vooral in de proximale tubulus vinden de reabsorptie van water en de ‘terugwinning’ van essentiële stoffen zoals Na^+ , K^+ , Cl^- , glucose en andere opgeloste stoffen plaats. Ook wordt de meerderheid (ongeveer 60%) van het gefilterde Ca^{2+} gereabsorbeerd in de proximale tubulus, terwijl de meer distaal gelegen gebieden instaan voor kleinere fracties van Ca^{2+} -reabsorptie. Het transepitheliale transport van Ca^{2+} verloopt via twee verschillende routes, een transcellulaire en paracellulaire. Zowel de

hoge Ca^{2+} -permeabiliteit van de tubulus als het netto Ca^{2+} -transport ten gevolge van veranderingen in de transepitheliale elektrochemische gradiënt voor Ca^{2+} wijzen erop dat de paracellulaire route de belangrijkste is. De transcellulaire route, die bijgevolg van minder belang is, wordt gekarakteriseerd door een tweestapsproces waarbij influx van Ca^{2+} gevolgd wordt door zijn efflux (2). De balans tussen beide processen is noodzakelijk voor de intracellulaire Ca^{2+} -homeostase, die het onderwerp vormt van deze thesis.

1.4 De intracellulaire Ca^{2+} -homeostase

Een zeer grote Ca^{2+} -gradiënt bestaat over het plasmamembraan van alle eukaryote cellen, waaronder de proximale tubuluscellen van de nier. Het basale niveau van cytosolaire Ca^{2+} in primaire culturen van proximale tubuluscellen varieert van 70 nM tot 100 nM (3, 4, 5) terwijl in geïsoleerde proximale tubuli hogere waarden worden geregistreerd (6, 7). In het extracellulaire milieu daarentegen worden vrije Ca^{2+} -concentraties van 1 mM of meer teruggevonden, waarbij enkel de geïoniseerde fractie van fysiologisch belang is. Cytosolaire buffers helpen bij het behoud van een laag cytosolair Ca^{2+} -niveau, maar ze kunnen de oneindige bron van hoge Ca^{2+} die de cel omgeeft, niet aan. De transportsystemen die aanwezig zijn in de membranen van interne opslagplaatsen en in het plasmamembraan zijn daarom verantwoordelijk voor behoud van deze enorme Ca^{2+} -gradiënt. De Ca^{2+} -transporters, geïdentificeerd in het plasmamembraan, zijn enerzijds een Ca^{2+} -transporter aan de apicale zijde en anderzijds de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitwisselaar en het Ca^{2+} -ATPase aan de basolaterale zijde. Hun relatieve bijdrage in de Ca^{2+} -regulatie is nog onderwerp van discussie. Daarnaast zijn het endoplasmatisch reticulum, de mitochondriën en het golgi-apparaat de belangrijkste intracellulaire compartimenten met capaciteit om Ca^{2+} te accumuleren en vrij te laten (8, 9). De verschillende transportsystemen en mechanismen met een invloed op de intracellulaire Ca^{2+} worden in de secties 2 t.e.m. 8 beschreven.

2 Ca^{2+} -transportsystemen in de proximale tubulus

2.1 Ca^{2+} -kanalen

Het transport van Ca^{2+} over het apicale membraan wordt gemedieerd door L-type kanalen die een flux van Ca^{2+} toelaten volgens een inwaarts gericht elektrochemische gradiënt (fig. 2)(10).

2.2 De Na⁺/Ca²⁺-uitwisselaar

Na⁺/Ca²⁺-uitwisseling aan de basolaterale zijde van het plasmamembraan is een secundair actief transportmechanisme dat cellulaire Ca²⁺-efflux koppelt aan de inwaartse elektrochemische gradiënt voor Na⁺ (fig. 2). De uitwisselaar kan echter ook in tegengestelde richting werken, afhankelijk van de grootte van de elektrochemische gradiënten voor Na⁺ en Ca²⁺, waarbij Ca²⁺ opgenomen wordt in uitwisseling voor Na⁺ (11).

2.2.1 Is de Na⁺/Ca²⁺-uitwisselaar aanwezig in de proximale tubulus?

Argumenten op functioneel niveau

Aangezien de inwaartse Na⁺-gradiënt het resultaat is van een functioneel Na⁺/K⁺-ATPase, zou blokkade van deze pomp met *ouabaine* het verlies van deze gradiënt tot gevolg hebben. Als de Na⁺/Ca²⁺-uitwisselaar betrokken is bij de cytosolaire Ca²⁺-regulatie wordt verwacht dat de efflux van Ca²⁺ via deze uitwisselaar geïnhibeerd wordt, resulterend in een stijging van vrije [Ca²⁺]_i zowel als totale cellulaire Ca²⁺. Ook substitutie van extracellulaire Na⁺ voor andere kationen zoals choline of Li⁺ zou dit effect teweegbrengen omdat ook in dit geval de inwaarts gerichte Na⁺-gradiënt teniet gedaan wordt (12).

Hoewel de Na⁺/Ca²⁺-uitwisselaar een verklaring zou bieden voor de gestegen [Ca²⁺]_i in hoger genoemde omstandigheden, zijn er andere mogelijkheden die hiervoor verantwoordelijk kunnen zijn, met gevolg dat de aanwezigheid van de Na⁺/Ca²⁺-uitwisselaar twijfelachtig is. De vervanging van Na⁺ met choline zou enerzijds het plasmamembraan Ca²⁺-ATPase kunnen inhiberen of anderzijds Ca²⁺-vrijlating van de mitochondriën kunnen stimuleren. Ook zou, omwille van de concurrentie tussen Na⁺- en Ca²⁺-ionen voor negatief geladen bindingsplaatsen aan de extracellulaire zijde van de membraan, een daling in extracellulaire [Na⁺] Ca²⁺-binding aan de negatief geladen plaatsen versterken, wat resulteert in een gestegen passieve diffusie in de cel (5).

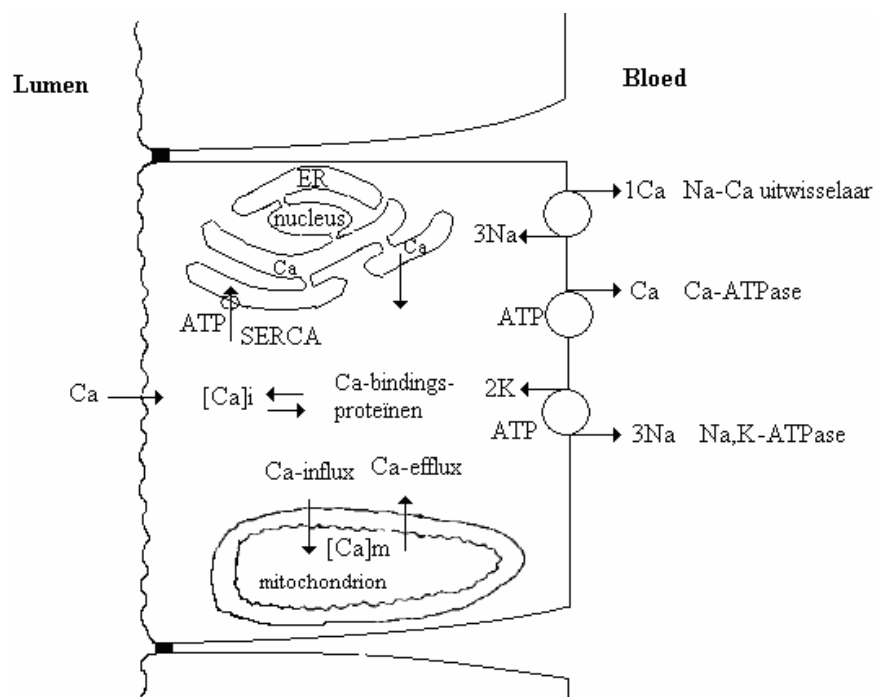
Niet enkel de aanwezigheid van de Na⁺/Ca²⁺-uitwisselaar is onderwerp van discussie, maar ook zijn transportactiviteit. Volgens Dominguez et al. is deze transporter in staat grote hoeveelheden Ca²⁺ uit de cel te verwijderen, zelfs wanneer [Ca²⁺]_i onder het basale niveau valt (13). White et al. daarentegen trokken de hypothese van de Na⁺/Ca²⁺-uitwisselaar als vitale regulator van Ca²⁺-niveaus in twijfel (11).

Argumenten op moleculair niveau

De $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitwisselaar (NCX1) kent een uitgebreide weefseldistributie, met transcripten die tot expressie worden gebracht in het hart, de hersenen, de nieren en andere weefsels. NCX1 codeert voor een proteïne dat ~ 125 kDa groot is (11). Pogingen om de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitwisselaar te lokaliseren in specifieke nefronsegmenten resulteerden, net zoals bij de functionele studies, in controversiële bevindingen.

In een geïmmortaliseerde proximale tubulusceldlijn van de muis werd het NCX1-transcript niet tot expressie gebracht en kon het mature NCX1 uitwisselaarsproteïne ook niet gedetecteerd worden, terwijl in proximale tubuli van de rat zowel het gen als het proteïne werd teruggevonden (10, 13). Deze resultaten sluiten de mogelijkheid van soortspecifieke expressie van NCX1 in proximale tubuluscellen niet uit (11).

Ramachandran et al. daarentegen verwerpen deze mogelijkheid in een studie, die aantoont dat de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitwisselingsactiviteit exclusief gelokaliseerd is in de distale tubulus (14).



Figuur 2: Ca^{2+} -transportsystemen van de proximale tubulusceld

2.3 Het Ca^{2+} -ATPase

Indien de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitwisselaar geen belangrijke rol zou spelen in de Ca^{2+} -efflux, kan deze functie nog vervuld worden door het Ca^{2+} -ATPase aanwezig in het plasmamembraan (PMCA). Deze Ca^{2+} -pomp is een primair actief transportmechanisme betrokken bij de fijnregulatie van cytosolaire Ca^{2+} -activiteit. De energie om Ca^{2+} tegen zijn elektrochemische

gradiënt naar buiten te drijven is afkomstig van ATP-hydrolyse (fig. 2). PMCA's behoren tot de P-type ATPases, d.w.z. dat een geordende cyclus van twee conformationele stadia doorlopen wordt om Ca^{2+} -ionen te transporteren. Ze worden gecodeerd door 4 genen, PMCA1-PMCA4. In proximale tubuluscellen werd bewijs geleverd voor PMCA1 en PMCA4 als belangrijke mRNA's (11).

De Ca^{2+} -pomp is enkel functioneel wanneer ze gelokaliseerd is in invaginaties van het plasmamembraan, caveolae genoemd. De caveolaire lokalisatie vergemakkelijkt de interactie met modulators en andere belangrijke kanaalstructuren (15).

3 Intracellulaire Ca^{2+} -bindingsproteïnen

Intracellulaire Ca^{2+} -bindingsproteïnen binden Ca^{2+} bij een gestegen cytosolaire Ca^{2+} -concentratie om een lage $[\text{Ca}^{2+}]_i$ te garanderen (fig. 2). Deze cellulaire buffers zijn verspreid doorheen de cel op een functionele en niet-uniforme manier (16). Transcellulair transport van Ca^{2+} vindt voornamelijk plaats in het distale nefron. In dit nefronsegment zijn Ca^{2+} -bindingsproteïnen zoals calbindine-D28k beschreven (17).

4 Het endoplasmatische reticulum (ER)

In het ER, dat zich als een enorm 3D-web verspreidt in cellen, kunnen drie morfologisch verschillende regio's geïdentificeerd worden: het gladde en ruwe ER, en het nucleaire membraan. Op gebied van Ca^{2+} -regulatie wordt geen kwalitatieve differentiatie waargenomen. Iedere regio bezit Ca^{2+} -kanalen en -pompen voor opname en vrijlating van Ca^{2+} (18). Quantitatief bekeken zijn de dichtheid en verspreiding van deze proteïnen echter zeer heterogeen. Clustering van Ca^{2+} -transporters in discrete gebieden kan ontstaan geven aan Ca^{2+} -microdomeinen waarbij één bepaald gebied van de cel hogere cytosolaire Ca^{2+} concentraties heeft. De hoge capaciteit van het cytoplasma om Ca^{2+} te bufferen en bijgevolg de zeer trage diffusiesnelheid van Ca^{2+} dragen ook bij aan het behoud van deze microdomeinen (19).

4.1 SERCA-pompen

Het ER is de grootste intracellulaire opslagplaats voor Ca^{2+} . SERCA-pompen, die aanwezig zijn in het ER-membraan, verbruiken ATP om Ca^{2+} -ionen in het ER te pompen (fig. 2). Deze Ca^{2+} -pompen, die net zoals de PMCA's behoren tot de P-type ATP-ases, worden gekarakteriseerd door een hoge capaciteit en een lage affiniteit voor Ca^{2+} -opname. De

SERCA-familie wordt gecodeerd door drie genen, SERCA1-3, waarvan SERCA-3 van belang is in niet-spiercellen, waaronder misschien proximale tubuliscellen (19).

Thapsigargin is een specifieke irreversibele inhibitor van de SERCA-pomp. Zijn inhiberende werking is te wijten aan de interactie van thapsigargin met de SERCA-pomp. Hierbij wordt een 1:1 stoichiometrisch complex gevormd. Dit belet de opname van Ca^{2+} dat uit het ER lekt, wat leidt tot snelle stijgingen in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ via directe ontlading van opgeslagen Ca^{2+} (20).

4.2 ER-buffermoleculen

Eens in het ER worden de ionen gebonden door hoge concentraties van gespecialiseerde buffermoleculen zoals calsequestrine. Deze buffermoleculen hebben geen gekende ‘trigger’ functie maar fungeren als dynamische opslagmoleculen (16).

4.3 Ca^{2+} -release kanalen

Ca^{2+} -vrijlating van het ER wordt gemedieerd door binding van inositoltrisfosfaat (IP_3) aan de IP_3 -receptoren, ingebed in het ER-membraan. IP_3 is een molecule dat gevormd wordt als gevolg van hydrolyse van fosfoinositiden aanwezig in het plasmamembraan. De interactie van agonisten met hun receptoren is mogelijk om deze cascade op gang te brengen (21).

Naast de IP_3 -receptor is ook de ryanodine-receptor een kanaal betrokken bij de Ca^{2+} -vrijlating van het ER. cADP-ribose, NAADP en Ca^{2+} zelf (via Ca^{2+} -geïnduceerde Ca^{2+} -vrijlating) zijn modulators van deze receptor.

Het proteïne-importcomplex van het ER, het zogenaamde translocon zou ook bijdragen aan het Ca^{2+} -lek van het ER (19) (fig. 2).

5 Mitochondriën

Naast het ER hebben ook mitochondriën een grote capaciteit om Ca^{2+} te accumuleren (fig. 2). De effectieve buffercapaciteit van de mitochondriën blijkt uit het feit dat ongeveer 50% van de totale hoeveelheid Ca^{2+} in de cel zich mitochondriaal bevindt. Het belang van de mitochondriën in het behoud van cellulaire Ca^{2+} -homeostase hangt in grote mate af van de hoeveelheid van dat organel in de cel. Aangezien proximale tubuliscellen zeer rijk zijn aan mitochondriën, is het aannemelijk dat mitochondriën een groot aandeel hebben in de Ca^{2+} -regulatie (6, 22). De volgende hypothesen werden in dit verband onderzocht.

5.1 Mitochondriën zouden snel mobiliseerbare Ca^{2+} -opslagplaatsen zijn

Studies in de jaren '60 toonden aan dat geïsoleerde mitochondriën snel Ca^{2+} kunnen opnemen wanneer ze geïncubeerd worden in een medium voorzien van Ca^{2+} . De zeer grote H^+ -elektrochemische gradiënt, gegenereerd door de translocatie van H^+ -ionen over het binnenste mitochondriale membraan, wordt dus niet enkel gebruikt om de reactie van ADP-fosforylatie te laten doorgaan, maar ook om kationen zoals Ca^{2+} te accumuleren in de mitochondriale matrix. Het feit dat Ca^{2+} zou worden opgeslagen in mitochondriën en de waarneming dat dit Ca^{2+} kan worden vrijgezet in fysiologische en pathologische omstandigheden leidden tot het idee dat mitochondriën snel mobiliseerbare Ca^{2+} -opslagplaatsen zouden kunnen zijn (19).

5.2 Mitochondriën zouden relatief inactieve organellen zijn in de cellulaire Ca^{2+} -homeostase

In de jaren '80 werd het concept van mitochondriën als actieve Ca^{2+} -opslagplaatsen verlaten en werd alle aandacht gevestigd op het ER. Het ER, en niet de mitochondriën, bevat namelijk de moleculaire elementen van een Ca^{2+} -opslagplaats, waaronder Ca^{2+} -pompen, -kanalen en -bufferproteïnen.

Tegelijkertijd leek ook de mogelijkheid dat mitochondriën Ca^{2+} opnemen na fysiologische stimulatie, dus werkend als Ca^{2+} -sinks, twijfelachtig. Door de beschikbaarheid van Ca^{2+} -indicators kon bevestigd worden dat in levende cellen niet enkel de basale Ca^{2+} -waarden, maar ook deze na fysiologische stimulatie beneden de affiniteit van de mitochondriale Ca^{2+} -transporters waren (deze voorspeld van eerder werk met geïsoleerde mitochondriën). Enkel in het geval van overlading met Ca^{2+} (in pathologische toestanden) zouden mitochondriën grote hoeveelheden van Ca^{2+} kunnen opnemen.

Hoewel een studie aantoonde dat de fijnregulatie van mitochondriale metabole enzymen afhankelijk is van de fluctuaties van de Ca^{2+} -concentratie in de mitochondriale matrix bleef het beeld van mitochondriën als inactieve organellen in het complexe proces van cellulaire Ca^{2+} -homeostase behouden (19).

5.3 Mitochondriën zouden fungeren als sinks

Toen de mogelijkheid ontstond om de mitochondriale Ca^{2+} -concentratie ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) te meten in intacte cellen, werd aangetoond dat mitochondriën prompt antwoorden op cytosolaire Ca^{2+} -stijgingen door Ca^{2+} op te nemen. De mitochondriale Ca^{2+} -opname verloopt parallel aan de cytosolaire Ca^{2+} -stijgingen, geïnduceerd door ontlading van Ca^{2+} uit het ER. De interactie

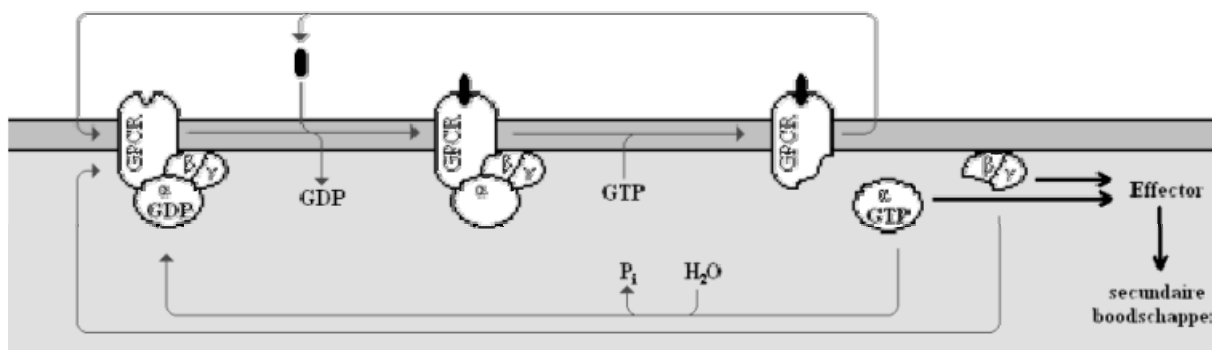
tussen het ER en de mitochondriën leek dus de sleutel te zijn voor de rol van de mitochondriën in de intracellulaire Ca^{2+} -homeostase (19).

6 Andere intracellulaire Ca^{2+} -opslagplaatsen

Het ER en de mitochondriën zijn weliswaar de best gekarakteriseerde intracellulaire compartimenten met de capaciteit om Ca^{2+} te accumuleren en vrij te laten. Maar ook andere organellen zoals endosomen, het golgi-apparaat en lysosomen kunnen, hoewel in mindere mate, fungeren als Ca^{2+} -opslagplaatsen (19).

7 Effecten van hormonen die ageren via Ca^{2+} als *second messenger*

Sommige hormonen die een rol spelen in de functie van de nier zijn in staat ‘uitbarstingen’ van Ca^{2+} teweeg te brengen in het cytosol. Het ‘aan’zetten van de signaalcascade die hiertoe leidt, gebeurt door binding van het hormoon aan de plasmamembraanreceptor. In deze thesis wordt dieper ingegaan op de hormonen, bradykinine en angiotensine II. Bij beide hormonen behoort de plasmamembraanreceptor tot de G-proteïne gekoppelde receptoren (GPCR's) (fig. 3) (2).



Figuur 3: De activering van heterotrimere G-proteïnen door GPCR's

7.1 Bradykinine

Bradykinine (BK) is een natuurlijk voorkomend peptidehormoon, opgebouwd uit negen aminozuren (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), dat ontstaat door de activiteit van het kallikreïne-kinine systeem (23).

BK en de gerelateerde kinines zijn betrokken bij talrijke processen zoals nociceptie, inflammatie en de bloeddrukregulatie. De rol van het kallikreïne-kinine systeem in de nier is echter nog niet duidelijk gedefinieerd, hoewel alle componenten van dit systeem aanwezig zijn. Daarom was de lokalisatie van deze componenten in het nefron van primair belang (24).

Kallikreïne en kininogeen zijn aanwezig in de cellen van het distale nefron, wat erop wijst dat bradykinine geproduceerd wordt in dit nefronsegment. Het distale nefron is echter niet alleen de belangrijkste plaats voor kininevorming, maar is ook essentieel voor de werking van het hormoon. Specifieke binding van bradykinine is immers het hoogst in de corticale en medullaire verzamelbuizen maar is ook, hoewel in mindere mate, aanwezig in de glomerulus, proximale tubulus, corticale dikke opstijgende lis van Henle en distale tubulus (24).

7.1.1 Bradykininereceptoren

De werking van kinines wordt gemedieerd door twee types receptoren. De B1 receptor wordt enkel tot expressie gebracht als gevolg van schadelijke stimuli zoals LPS, inflammatoire mediators en groeifactoren. De B2-receptor daarentegen wordt constitutief tot expressie gebracht in talrijke weefsels. De twee subtypes worden onderscheiden op basis van hun respons op des-Arg⁹-BK, een B1-receptoragonist. B2-receptoren vertonen een hogere affiniteit voor BK vergeleken met des-Arg⁹-BK, terwijl B1-receptoren gevoeliger zijn voor des-Arg⁹-BK (23). Het bestaan van een derde receptor (B3) is nog controversieel.

Recent werd een nieuwe hoge affiniteitsreceptor voor bradykinine, namelijk G-proteïne gekoppelde receptor 100 (GPR100), beschreven die gekoppeld is aan G α_q -proteïne-siginaaltransductie. Zijn bindingseigenschappen lijken sterk op die van de B2 receptoren (25).

7.1.2 Signaaloverdracht

Bij stimulatie van de B2-receptoren zorgt de α -subeenheid van G_q voor de activatie van fosfolipase C, wat resulteert in de vorming van inositoltrisfosfaat (IP₃) en diacylglycerol (DAG). De intracellulaire boodschapper, IP₃, bindt aan zijn receptor in het ER-membraan, wat leidt tot Ca²⁺-vrijlating.

Een snelle, transiënte stijging van intracellulaire calcium die daarenboven concentratie-afhankelijk is, wordt waargenomen zowel in de TKPTS cellijn (afgeleid van proximale tubuli van de muis), als in een primaire cultuur van proximale tubuluscellen van het konijn. Dit is het resultaat van calciumvrijlating van de intracellulaire opslagplaatsen (26, 27).

7.1.3 Effect van kininases

De brushborder van proximale tubuluscellen van de nier is zeer rijk aan peptidases (exo- en endopeptidases), die verantwoordelijk zijn voor de hydrolyse van peptides aanwezig in het glomerulaire filtraat. Ook bradykinine ontkomt er niet aan. Eén of meer peptidebindingen van dit molecuul zijn onderhevig aan de hydrolytische activiteit van de peptidases, meer bepaald

de kininases. De intense peptidase-activiteit zou bescherming bieden tegen niet-fysiologische effecten van de peptiden, die mogelijk optreden wanneer ze meer geconcentreerd geraken in de distale tubuli en verzamelbuizen (28). Beide kininase II en neutraal endopeptidase 24.11 zijn in hoge concentraties aanwezig in de brushborders van de proximale tubuli en zijn belangrijke kinine vernietigende enzymen. Kininase II, ook gekend als ‘angiotensin convertend enzyme’ (ACE) is bifunctioneel, naast zijn hydrolyserende werking staat het ook in voor de vorming van angiotensine II uit angiotensine I (29).

7.2 Angiotensine II

Angiotensine II (AngII) is een natuurlijk voorkomend octapeptide (Asp1-Arg-Val-Tyr-Ile/Val-His-Pro-Phe8) dat in picomolaire concentraties circuleert in de bloedbaan. Het actieve peptidehormoon wordt gevormd door het angiotensine-converterend enzyme (ACE) uit angiotensine I, wat op zijn beurt onder invloed van renine gevormd wordt uit angiotensinogeen. Aangezien al deze componenten van het renine-angiotensine-systeem (RAS) tot expressie komen in proximale tubuluscellen, is intracellulaire productie van AngII ook een mogelijkheid. De hormonale werking van AngII resulteert onder andere in effecten op de hemodynamica en het tubulair epitheliale transport van de nier (30, 31).

7.2.1 AngII-receptoren

Zoals veel andere hormonen oefent angiotensine II zijn biologische effecten uit via specifieke receptoren, gelokaliseerd in de cellulaire plasmamembraan. Intracellulaire receptoren, ofwel geïnternaliseerd via endocytose ofwel gesynthetiseerd door de cel zelf, kunnen echter ook van belang zijn (32). De diversiteit van de werking van AngII kan ondermeer te wijten zijn aan de aanwezigheid van twee farmacologisch verschillende types van AngII receptoren, namelijk type 1 (AT1) en type 2 (AT2) receptoren, alsook hun verschillende distributie en tijdsafhankelijke expressie. Bij de rat en de muis zijn op basis van hun expressiepatroon twee AT1 gensubtypes geïdentificeerd, AT1A en AT1B. De belangrijkste biologische effecten van AngII, waaronder de stimulatie van het proximale tubulaire transport, worden gemedieerd door de stimulatie van de AT1R subtypes. De fysiologische functie van AT2 receptoren is nog niet volledig opgehelderd (33, 34).

AngII receptoren zijn aanwezig in alle nefronsegmenten, met de hoogste densiteit in de proximale tubulus. Omwille van het overvloedige lumenale celoppervlak geassocieerd met de microvilli van proximale tubuluscellen en omwille van identieke receptordensiteit aan

brushborder (lage affiniteitsbinding) en basolaterale membranen (hoge affiniteitsbinding), worden meer lumenale dan contraluminale receptoren aangetroffen per cel (30, 35).

7.2.2 Signaaloverdracht

De werking van AngII op de proximale tubuluscel wordt mogelijk gemedieerd door drie verschillende mechanismen (36).

PLC-pathway

In talrijke weefsels, zoals het glomerulaire mesangium en de vasculaire gladde spier, leidt stimulatie van de AT₁-receptor met nanomolaire concentraties van AngII tot activatie van PLC met intracellulaire vorming van DAG en IP₃. IP₃ stimuleert op zijn beurt het vrijkomen van Ca²⁺ uit intracellulaire opslagplaatsen (37).

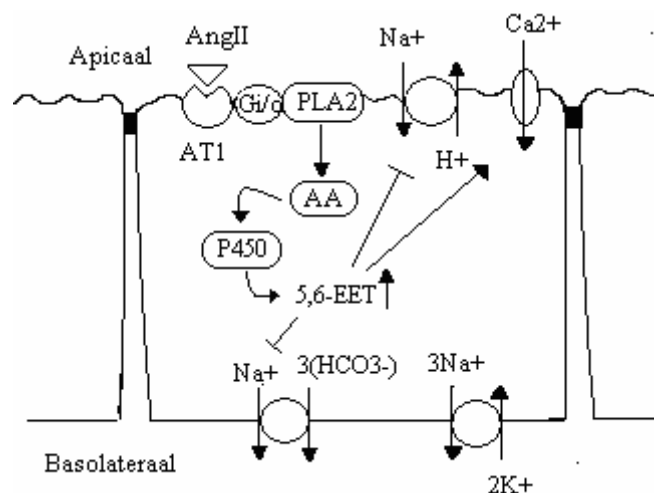
In dit concentratiebereik is AngII niet in staat transiënte stijgingen in cytosolair Ca²⁺ te veroorzaken in proximale tubuluscellen. Hogere concentraties van AngII, in het micromolaire bereik, kunnen daarentegen fosfatidylinositol en fosfatidylcholine turnover doen stijgen in gemicrodissecteerde proximale tubuli van de muis, met transiënte stijgingen in [Ca²⁺]_i als gevolg (38). De hypothese dat AngII-receptoren gekoppeld zijn aan de PLC-pathway in proximale tubuluscellen stootte echter ook op verzet. Volgens Welsh et al. was de stijging in [Ca²⁺]_i niet het gevolg van een stijging in IP₃-productie, maar zou de Ca²⁺ van extracellulaire oorsprong zijn (39). Een combinatie van beide hypothesen koppelde de cytosolaire [Ca²⁺]-stijging aan Ca²⁺-vrijlating van intracellulaire opslagplaatsen, gemedieerd door IP₃, en aan Ca²⁺-influx van extracellulaire bron (40).

PLA₂-pathway

De eerste stap in de PLA₂-signaaltransductiecascade is de binding van AngII aan de AT₁-receptor, wat leidt tot de activatie van een G-proteïne dat behoort tot de G_i/G₀-familie. Fosfolipase A₂ (PLA₂) katalyseert de vrijlating van arachidonzuur dat geësterifieerd is aan het tweede C-atoom van de glycerolruggengraat van membraanfosfolipiden. Arachidonzuur wordt op zijn beurt enzymatisch omgezet naar biologisch actieve metabolieten, eicosanoiden genoemd (2).

In de proximale tubulus neemt 5,6-EET, een metaboliet van arachidonzuur dat geproduceerd wordt door een cytochroom P450-epoxygenase, een belangrijke plaats in de signaaltransductie van AngII in. 5,6-EET medieert het inhiberende effect van AngII op Na⁺ en

bicarbonaattransport via effecten op Ca^{2+} . De $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -stijgingen in respons op AngII en zijn intermediaren zijn het gevolg van Ca^{2+} -influx via Ca^{2+} -transporters, waarschijnlijk voltage-gevoelige Ca^{2+} -kanalen (fig. 4) (37, 41).



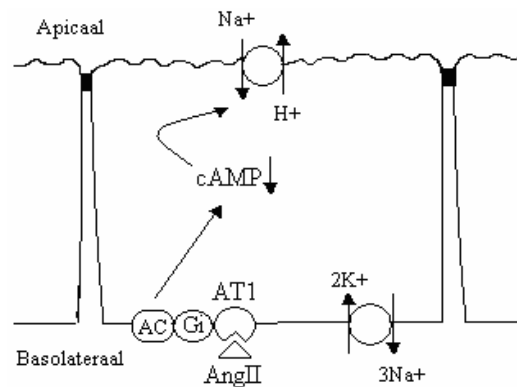
Figuur 4: Signaaltransductie van AngII via PLA_2 (AA: Arachidonic Acid)

De rol van PLA_2 in de AngII signaalcascade werd echter in vraag gesteld door de observatie dat ketoconazole, een inhibitor van het epoxygenase, het effect van AngII op de Ca^{2+} -influx niet inhiberde (42).

Adenylaat cyclase

Een ander belangrijk en erg gevoelig mechanisme van signaaltransductie voor AngII in nierepitheelcellen omvat adenylaat cyclase (fig. 5). Lage concentraties van AngII (pM-nM) inhiberen adenylaat cyclase en bijgevolg cAMP-vorming in primaire culturen van proximale tubuluscellen (30). Dit gebeurt via koppeling van de AT1 receptor aan het inhiberende en pertussis toxine-gevoelige G_i -proteïne (39).

De belangrijkste transporter gelinkt aan AngII in proximale tubuluscellen is de apicale Na^+/H^+ -uitwisselaar. Een gedaalde cAMP-vorming resulteert in een verminderde proteïne kinase A (PKA) activiteit, met een gedaalde fosforylatie van de Na^+/H^+ -antiporter als gevolg. Het resultaat is een versterkte Na^+ -reabsorptie en H^+ -secretie (fig. 5).



Figuur 5: Signaaltransductie van AngII via adenylyl cyclase (AC)

De invloed van AngII op de Na^+/H^+ -uitwisseling is een dosis-afhankelijk bifasisch effect. Lage concentraties (pM-nM) stimuleren de transporteractiviteit (40) terwijl hoge concentraties (nM- μM), zoals gezien in hanen (43), een inhiberende werking hebben en daarnaast cytosolaire Ca^{2+} zullen doen stijgen. Mogelijk is deze Ca^{2+} -stijging de oorzaak van het geïnhibeerde Na^+ -transport, leidend tot natriurese (41).

8 Regulatie van $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Op lange termijn wordt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gereguleerd door het evenwicht tussen influx- en effluxmechanismen over het plasmamembraan. Modulatie van de activiteiten van organellen die Ca^{2+} accumuleren of vrijlaten, of zelfs veranderingen in het niveau van Ca^{2+} -buffers in het cytoplasma, beïnvloeden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ enkel transiënt (19).

Zo veroorzaakt vrijlating van Ca^{2+} uit het ER, in respons op hormoonstimulatie, initieel een stijging in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die transiënt van aard is. Dit is te wijten aan verwijdering van Ca^{2+} uit het cytosol door opname in de mitochondriën en het ER, en extrusie van Ca^{2+} via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitwisselaars en Ca^{2+} -ATPases in het plasmamembraan.

Ontlading van Ca^{2+} uit het ER veroorzaakt na de transiënte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -stijging een onderhouden gestegen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -niveau. De val van de Ca^{2+} -inhoud van het ER leidt immers tot het snel hervullen van de Ca^{2+} -opslagplaatsen opdat de cel klaar zou zijn voor een nieuwe stimulus. Daarnaast is de aanwezigheid van Ca^{2+} in het ER noodzakelijk voor proteïnesynthese en –vouwning. De intracellulaire opslagplaatsen in talrijke cellen, waaronder epitheelcellen, zijn gekoppeld aan *store-operated Ca^{2+} -kanalen (SOC's)* in het plasmamembraan. Wanneer de Ca^{2+} -opslagplaatsen hervuld zijn, sluiten de SOC's (19).

In een aantal studies lijkt store-depletie niet sterk gekoppeld te zijn aan store-operated influx. Ca^{2+} -vrijlating kan in dit geval gebeuren zonder Ca^{2+} -influx te veroorzaken. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat er een drempelwaarde bestaat waaronder de intraluminale Ca^{2+} -inhoud moet vallen voordat store-operated entry ontwikkelt. Een andere optie is dat tenminste twee functionele Ca^{2+} -opslagplaatsen bestaan, maar dat slechts één ervan gelinkt is aan store-operated entry (19).

In het geval van een $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -daling echter, zal de cel trachten het basale Ca^{2+} -niveau terug te bereiken. Ca^{2+} -vrijlating uit mitochondriën en andere intracellulaire opslagplaatsen kan samen met de omkering van de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitwisselaar zorgen voor herstel van het basale niveau.

9 Cadmium: Opname door proximale tubulussellen en zijn toxische effecten

Cadmium (Cd) is een zwaar metaal dat in 1817 ontdekt werd door de Duitse chemicus Friedrich Stromeyer. Het nieuwe element werd geïdentificeerd als een onzuiverheid in het mineraal calamiet (zinkcarbonaat). De zinkproductie, met cadmium als onvermijdbaar bijproduct, heeft dus in grote mate bijgedragen tot de verspreiding van Cd in het milieu. Andere belangrijke bronnen van Cd zijn fosfaatertsen waaruit kunstmest wordt geproduceerd en de verbranding van fossiele brandstoffen.

Bij mens en dier gebeurt de blootstelling aan Cd voornamelijk via gastro-intestinale absorptie en inhalatie van gecontamineerde lucht. Vooral rokers hebben hierdoor een verhoogd risico op Cd inname. Een sigaret bevat namelijk 1 tot 2 μg Cd. Voor niet-rokers is de orale inname van Cd echter de belangrijkste opnameroute (44).

Het pulmonaal en enteraal geabsorbeerde Cd, dat eerst in de systemische circulatie terechtkomt, heeft een hoge affiniteit voor sulfhydrylgroepen wat resulteert in complexvorming met proteïnen, zoals albumine en metallothioneïnes (MT), of met peptiden, zoals glutathione (GSH) en cysteïne. Een kleine fractie van Cd ontsnapt echter aan deze binding en bevindt zich als de vrije, geïoniseerde vorm in het plasma. Via de portale circulatie worden de verschillende vormen van Cd afgezet in de lever, waar ze worden opgeslagen. Een deel wordt echter vrijgelaten in het plasma te wijten aan turnover van hepatocyten of schade aan de lever. Na filtratie doorheen de glomerulus kunnen de verschillende Cd-species opgenomen worden door de proximale tubulussellen (45).

9.1 Opname van Cd in proximale tubuluscellen

Proximale tubuluscellen, voornamelijk deze van het S1-segment, hebben een hoge capaciteit voor reabsorptie van Cd. De transportsystemen die hierbij betrokken zijn, zijn tot op heden echter onduidelijk. Tubulaire reabsorptie hangt bovendien af van de chemische vorm waarin Cd aanwezig is in het glomerulaire filtraat (fig. 6) (45).

9.2 Transport van geïoniseerd Cd

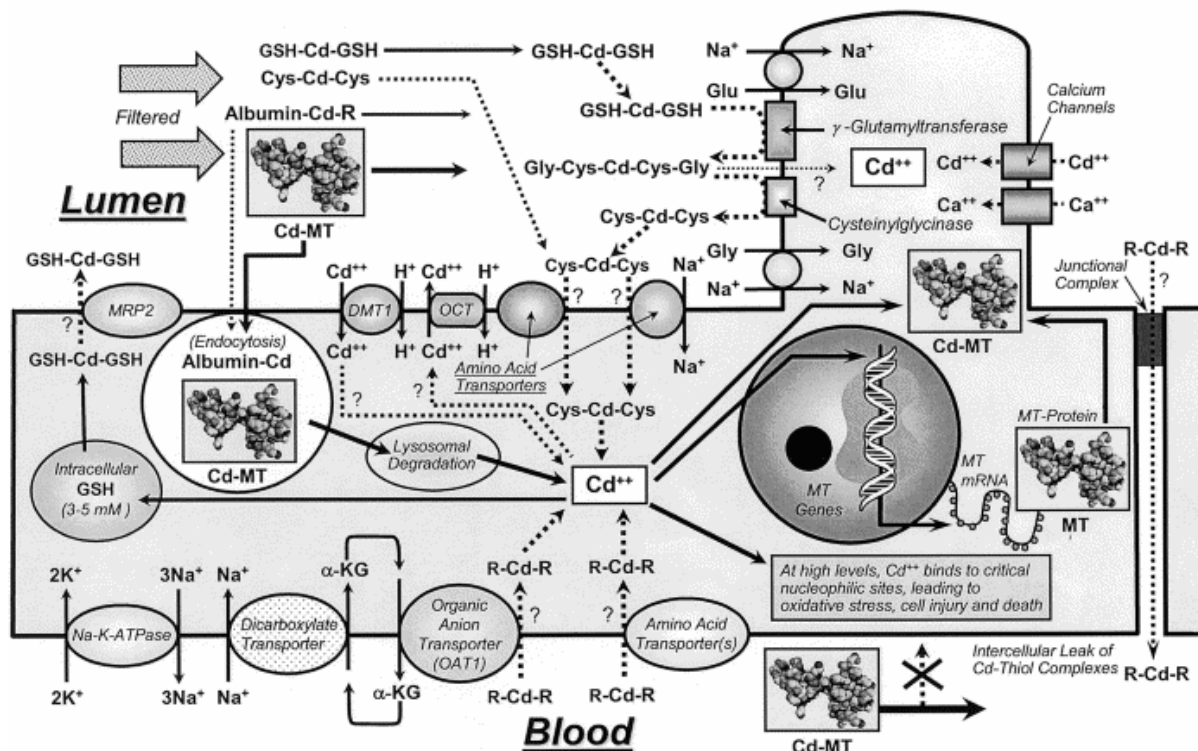
Transporters van essentiële metalen, zoals Zn en Cu, zijn mogelijk betrokken bij de opname van geïoniseerd Cd, aangezien Cd in competitie gaat met deze divalente metalen. De opname van Cd via Ca^{2+} -kanalen is echter controversieel, aangezien de aanwezigheid van deze kanalen in het lumenale membraan van proximale tubuluscellen nog niet is bevestigd (45, 46).

9.3 Transport van gebonden Cd

De fractie van gefilterd Cd die gebonden is aan proteïnen (zoals albumine en/of MT) wordt via receptorgemedieerde endocytose getransporteerd in het intracellulaire compartiment. Binding aan de multiligandereceptorproteïnen megaline en cubiline gaat waarschijnlijk vooraf aan het endocytotische proces (45).

De S-conjugaten die Cd vormt met thiolen zoals GSH en cysteïne fungeren daarentegen als ‘moleculaire homologen’ die getransporteerd kunnen worden door de Na^+ /AZ-cotransporter. (44).

Ook kunnen bepaalde vormen van Cd ‘lekker’ in het basolaterale compartiment, aangezien de intercellulaire juncties tussen naburige proximale epitheelcellen relatief lek zijn. Het ‘lekachtige’ karakter wordt versterkt door intoxicatie met Cd, wanneer Ca^{2+} binding aan het E-cadherine/catenine netwerk van de zonula adherens verstoord wordt. (47). Vervolgens kunnen Cd-conjugaten basolateraal opgenomen worden door organische anion en dicarboxylaattransporters alsook aminozuurtransporters. (44).



Figuur 6: Proximaal transport van Cd (44).

9.4 Secretie van Cd van proximale tubuluscellen

Secretie van Cd in het tubulaire lumen is mogelijk via een organisch kationtransportsysteem. Dit systeem omvat gefaciliteerde diffusie van Cd aan het basolaterale membraan, via de zojuist vermelde transporters, en een organisch kation/H⁺-antiport aan het brush bordermembraan (48). Tevens is er een vermoeden dat het ATP-bindingscassette proteïne MRP2 instaat voor de secretie van GSH-conjugaten over het lumenale membraan (44).

9.5 Mechanismen van Cd-toxiciteit in proximale tubuluscellen

Het gevaar bij blootstelling aan Cd berust in het feit dat het metaal geaccumuleerd wordt in het nierweefsel en slechts een kleine fractie geëxcreteerd wordt in de urine. Vooraleer Cd zijn toxische effecten echter kan manifesteren in het cytoplasmatische compartiment van de proximale tubuluscel moet het aanwezig zijn als een vrij ion. Wanneer Cd gecomplexed is door beschermende moleculen zoals MT zal het geen schade veroorzaken aan het intracellulaire milieu. Wanneer er een onevenwicht ontstaat tussen deze beschermende factoren en Cd, zal dit leiden tot Cd-toxiciteit (45). Hieronder worden hypothetische mechanismen van Cd toxiciteit beschreven in relatie tot de Ca²⁺ homeostase in proximale tubuluscellen. Een samenvatting van deze mechanismen wordt weergegeven in figuur 7. Eerder werd al een gestegen [Ca²⁺]_i beschreven in proximale tubuluscellen van knaagdieren

na behandeling met Cd. Dit ging ook gepaard met beschadiging van de cellulaire ultrastructuur (49).

9.5.1 Cd toxiciteit ter hoogte van de mitochondriën

Omwille van de vergelijkbare lading en ionische straal van het Ca^{2+} - en Cd^{2+} -ion (respectievelijk 0,099 en 0,097 nm) is de mitochondriale Ca^{2+} -uniporter (MCU) een target voor Cd. Interactie van Cd met thiolgroepen van specifieke membraanproteïnen zou conformationele veranderingen teweeg brengen die nodig zijn voor de activatie van Ca^{2+} -uniporter gemedieerde Cd-opname.

Eens opgenomen in de mitochondriën kan Cd de cellulaire respiratie verstoren met een verhoogde ROS-productie als gevolg (50). Oxidatieve stress ontstaat wanneer de productie van ROS de anti-oxidantverdedigingsmechanismen overtreft. Hierbij wordt schade aangericht aan DNA, proteïnen en lipiden. Een proteïne, dat onderhevig is aan Cd-geïnduceerde ROS-schade is het Na^+/K^+ -ATPase. Schade aan dit proteïne maakt het transport gemedieerd door Na^+ -afhankelijke transporters, zoals de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitwisselaar in het basolaterale membraan van proximale tubuluscellen, onmogelijk wat resulteert in een $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -stijging (51).

9.5.2 Cd toxiciteit ter hoogte van het ER

Cd heeft mogelijk een inhiberende werking op de intracellulaire Ca^{2+} -ATPases wat het laden van Ca^{2+} in het ER of eventueel andere opslagplaatsen verhindert. Dit zou een gestegen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tot gevolg hebben (52). Voor proximale tubuluscellen is er nog geen bewijs voor deze hypothese.

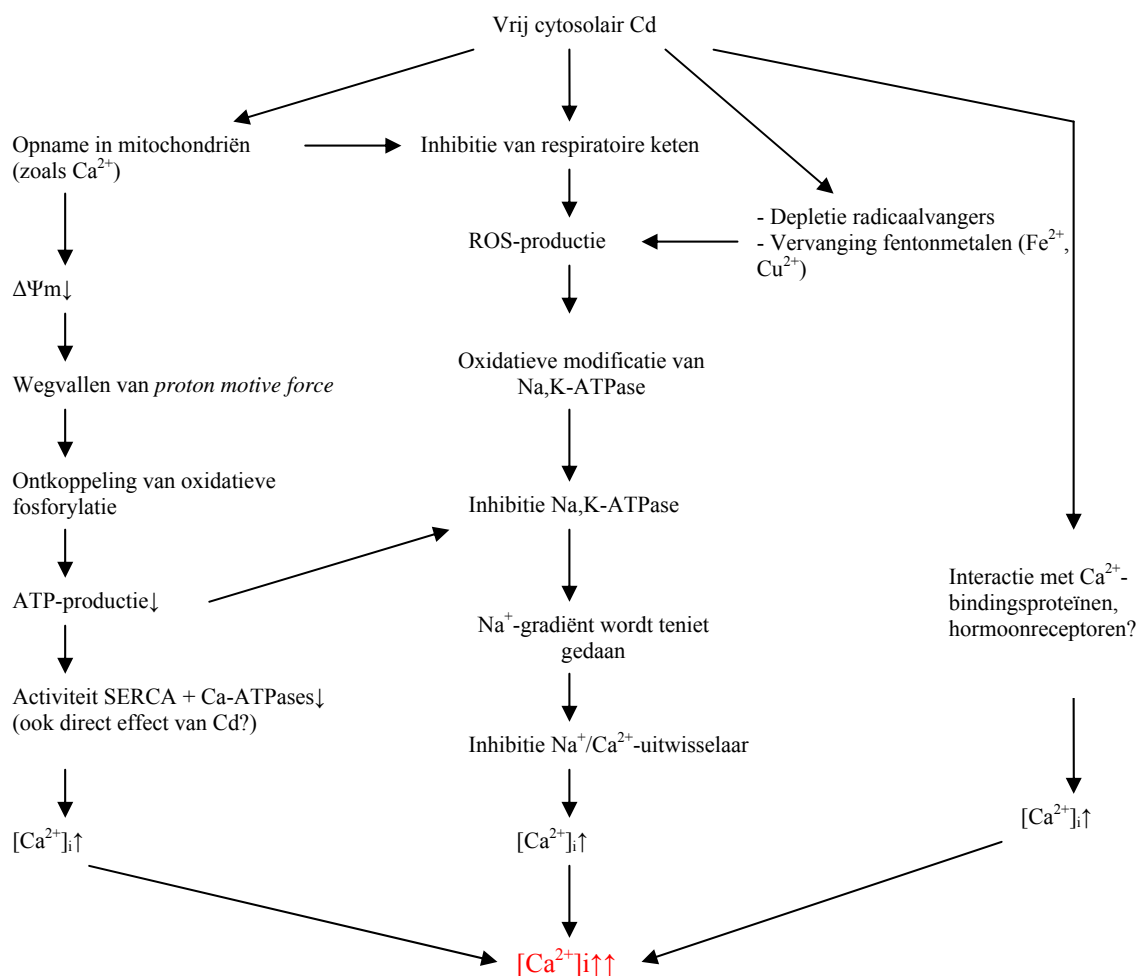
9.5.3 Interactie van Cd met intracellulaire proteïnen

Cd interageert mogelijk met intracellulaire proteïnen, die verwacht worden Ca^{2+} te bufferen in de cel (52).

9.5.4 Andere interactieniveaus van Cd

De hierboven beschreven hypothesen betreffen intracellulaire effecten van Cd eens Cd is binnengedrongen in de proximale tubuluscel. Cd kan 'extracellulair' echter ook effecten uitoefenen. De interactie van Cd met hormoonreceptoren ter hoogte van het plasmamembraan, met daaropvolgende activatie van de IP_3 -signaalpathway en vrijlating van Ca^{2+} uit de intracellulaire opslagplaatsen, leidt mogelijk tot een gestegen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (52). Cd interageert

echter ook met Ca^{2+} -kanalen in het plasmamembraan, wat de influx van Ca^{2+} via de kanalen verhindert (53).



Figuur 7: Mechanismen van Cd-toxiciteit met betrekking tot de Ca^{2+} -homeostase

10 Gevolgen van gestegen intracellulaire Ca^{2+} -concentratie

Zowel chronische blootstelling aan Cd als de eerder beschreven stimulatie met BK en AngII leiden tot een gestegen intracellulaire Ca^{2+} -concentratie. Terwijl een kortstondige Ca^{2+} -stijging essentieel is voor groei en differentiatie van proximale tubuluscellen is langdurige verhoging van cytosolaire Ca^{2+} echter toxisch en resulteert in celdood. Ca^{2+} promoot DNA-digestie door directe stimulatie van endonucleasen, of heeft een indirect effect door activatie van Ca^{2+} -afhankelijke proteasen, fosfatasen en fosfolipasen, met verlies van de structurele integriteit van de cel als gevolg. Opdat een cel apoptose kan ondergaan, is er echter voldoende ATP nodig om de processen van proteïne- en DNA-degradatie te voltrekken. Boven een bepaald ATP-niveau zal de cel afsterven via apoptose. Als de ATP-concentratie valt tot beneden dit kritieke niveau, zal necrose het mechanisme van celdood zijn (16).

11 Doelstellingen van het onderzoek

Eerder onderzoek heeft geleid tot de ontwikkeling van primaire culturen waarbij proximale tubuluscellen van de muis gegroeid worden op membranen (Terry S., ongepubliceerde resultaten). Het cultuursysteem beoogt een zo hoog mogelijke graad van differentiatie, de in vivo situatie zo goed mogelijk benaderend. Het doel van onze studie bestaat erin de primaire culturen verder te karakteriseren, meer bepaald de Ca^{2+} -homeostase ervan.

In vivo zijn receptoren aanwezig voor actoren die ageren via Ca^{2+} . Het is geweten dat de hormonen bradykinine (BK) en angiotensine II (AngII) een stijging in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ veroorzaken. Door de Ca^{2+} -respons te bestuderen na stimulatie met BK en AngII kan dus de aanwezigheid van de receptoren uitgetest worden.

Eerst werd getracht de techniek, om proximale tubuluscellen van de muis in cultuur te brengen, correct uit te voeren. Om na te gaan of de primaire cultuur bestaat uit proximale tubuluscellen werd de aanwezigheid van γ -glutamyltransferase, een membraangebonden enzyme aanwezig in de brush border van de proximale tubulus, uitgetest.

In deze primaire culturen werd de Ca^{2+} -homeostase bestudeerd met behulp van microfluorescentietechnieken. Hiervoor werd de Ca^{2+} -gevoelige, fluorescente probe Fura-2-acetoxymethyl ester (Fura-2/AM) gebruikt. Het correct opladen en calibreren van deze ratiometrische ion-indicator was hierbij in eerste instantie vereist. Nadat $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in basale omstandigheden was bepaald, werd nagegaan of de verwachte respons op de hormonen aanwezig was.

Om na te gaan of Cd^{2+} interfereert met het Ca^{2+} -metabolisme in de proximale tubuluscellen, werden de cellen gedurende 24 uur blootgesteld aan CdCl_2 .

Een tweede luik van deze thesis had als doel de vergelijking te maken tussen de Ca^{2+} -homeostase in primaire culturen en vers geïsoleerde proximale tubuli. De basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en de hormonale responsen werden vergeleken tussen beide in vitro systemen.

12 Primaire cultuur van proximale tubuluscellen van de muis

12.1 Materialen

12.1.1 Dissectiemateriaal

Het dissectiemateriaal, bestaande uit 2 scalpels, een recht pincet, 4 dumont pincetten nr. 5 en 1 chirurgisch schaarje, werd samen met 5 glazen petrischaaltjes, 1 bekertje (20ml) en 1 glazen vial gedurende 2 uur gesteriliseerd in de oven op 200°C, waarna het kon afkoelen onder de flow. De schroefdop van de glazen vial en de filters met een poriëgrootte van 250 µm en 80 µm werden gedurende 2 uur gesteriliseerd in alcohol en nadien onder de flow gedroogd.

12.1.2 Oplossingen

Dissectie-oplossing

De dissectie-oplossing (DO) bestond uit een standaard zoutoplossing, *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) (Gibco nr. 14025-050, Invitrogen, Merelbeke, België). Deze fysiologische zoutoplossing, samengesteld uit anorganische zouten en gesupplementeerd met glucose hield de cellen voor korte periodes in een levende toestand en had niet als doel groei te bevorderen. *Balanced salt solutions* worden ook gebruikt om weefsels en cellen te wassen en doen tevens dienst als verdunners voor de behandeling van cellen en weefsels met verschillende agentia. Hierbij wordt een fysiologische pH en osmotische druk behouden.

De gebruikte HBSS bevatte calcium en magnesium, maar geen fenolrood. Fenolrood inhibeerde immers de groei van nierepithelcellen (54).

Het standaardmedium werd gesupplementeerd met de volgende substraten: HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) (15 mM) (Acros Organics, Geel, België), D-glucose (4,4 mM) (Normapur, Leuven, België), glycine (5 mM) (Sigma, Bornem, België) en L-alanine (1 mM) (Acros Organics, Geel, België). De oplossing werd op pH 7,4 gebracht met TRIS-base en de osmolariteit werd aangepast met mannitol (Acros Organics, Geel, België) tot 325 mOsm. Om de DO te steriliseren werd ze onder de flow gefilterd doorheen een 0,22 µm filter (Millipore; Sterivex™-GS 0.22µm Filter Unit). Bewaring gebeurde bij 4°C.

Collagenase- en albumine-oplossing

De collagenase- en albumineoplossing werden pas 15 minuten voor het experiment klaargemaakt zodat de enzymatische werking van beide oplossingen goed bewaard bleef.

Er werd 3,840 mg SBTI (Fluka, Bornem, België), 10 mg collagenase (klasse II; Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) en 300 mg albumine (fractie V, bovine, Sigma, Bornem, België) afgewogen. De SBTI werd opgelost in 40 ml dissectie-oplossing. Tien ml van deze oplossing werd toegevoegd aan het afgewogen collagenase en 30 ml aan het afgewogen albumine. De bekomen collagenase-oplossing werd gefilterd doorheen een 0,22 µm filter, waarna hetzelfde gedaan werd met de albumine-oplossing om bacteriën en andere onzuiverheden te verwijderen. Beide oplossingen werden opgewarmd tot 37°C in een warmwaterbad.

De **collagenase-oplossing** staat in voor de proteolytische weefseldigestie. Collagenase klasse II is een mix van proteases, geprepareerd uit de anaerobe bacterie *Clostridium histoliticum*. Naast collagenase werken verschillende hydrolytische enzymen, waaronder trypsine, samen om het corticale bindweefsel af te breken. Deze contaminaties zorgen voor een optimale weefseldigestie, aangezien zeer zuiver collagenase slechts een lage weefseldigestiecapaciteit heeft. In te hoge concentraties is trypsine echter schadelijk voor de cellen. Veel exoproteïnen in het plasmamembraan, zoals hormoonreceptors, worden verteerd tijdens trypsinebehandeling (55). Daarom wordt Soyabean trypsine inhibitor (SBTI) gebruikt. SBTI zorgt voor de inhibitie van trypsine.

De **albumine-oplossing** staat in voor de inhibitie van de collagenase-activiteit na de digestieperiode.

Cultuurmedium

Het cultuurmedium (CM) bestond uit een mengsel van *Dulbecco's Modified Eagle's Medium en Ham's F12* (DMEM-Ham's F12) (1:1) (Gibco nr. 21041-025, Invitrogen, Merelbeke, België), een basismedium dat gesupplementeerd werd met HEPES (15 mM), pencilline (100 IU/ml)/streptomycine (100 µg/ml), L-glutamine (2 mM) (100x), natrium-pyruvaat (0,55 mM) en niet-essentiële aminozuren (10 ml/l, 100x) (allen Gibco, Invitrogen, Merelbeke, België).

De oplossing werd op pH 7,4 gebracht met TRIS-base, gefilterd doorheen 0,22 µm filter (Millipore; Millex[®]-GS Sterilizing Filter Unit) en bewaard op 4°C in het donker. Juist voor gebruik werd 25 ml cultuurmedium overgebracht in een falcon-tube en werden de volgende substraten toegevoegd: hydrocortisone (5×10^{-8} M, Sigma, Bornem, België), *insulin-*

transferrin-selenite-media supplement (1000x) (ITS-supplement, Sigma, Bornem, België) en warmte-geïnactiveerd *Fetal Calf Serum* (FCS, 1%, Hyclone®, Utah). Vervolgens werd het medium opgewarmd in een warmwaterbad (37°C).

De filters en de wellplaat

De gebruikte filters waren de *Transwell®-COL Collagen Coated PTFE* ('*Polytetrafluoroethyleen*') *membrane filters* met een diameter van 6,5 mm en een poriëgrootte van 0,4 µm. De filtertjes laten toe dat de celmonolaag langs beide kanten (apicaal en basolateraal) benaderd kan worden. De bodem van een filtertje is een dun, transparant polyestermembraan dat voorzien is van een laagje collageen om celadhesie en -groei te bevorderen.

Deze filtertjes worden in een 24-wellplaat gepositioneerd. De gebruikte platen waren de 24 well Cell Culture plates van Costar® (nr. 3524).

12.2 Methode

Proximale tubuli werden geïsoleerd uit de nieren van jong volwassen (3 à 4 weken oud), mannelijke C57/Bl6-muizen (B&K, Engeland). Na decapitatie van de muis werden de nieren zo snel mogelijk verwijderd met een chirurgisch schaarje en overgebracht in een bekertje met ijsskoude DO. Onder de flow werden de nieren getransfereerd naar een glazen petrischaaltje, gevuld met DO. Met behulp van twee dumont pincetten werd het kapsel rondom de nieren verwijderd. De nieren werden overgebracht in een petrischaaltje met verse DO, dat vervolgens op de gekoelde dissectie-opstelling werd geplaatst zodat het weefsel gedurende de gehele dissectie op 4°C gehouden werd. Met een scalpel (mesblad nr. 23) en een recht pincet werden de nieren eerst longitudinaal doorgesneden en vervolgens dwars door het midden van de hilus. De bekomen weefselstukjes werden overgebracht in een petrischaaltje met verse DO en met behulp van een scalpel (mesblad nr. 11) werden coronaire schijfjes van ongeveer 2 mm gemaakt vanuit de hilus. De cortex, waarin de proximale tubuli zich bevinden en gekenmerkt door de vaal roze kleur, kon nu visueel gescheiden worden van de medulla met de donkerrode kleur. Na de dissectie werden de stukjes cortex met een plasticen pasteurpipet overgebracht in een glazen vial en werd de DO verwijderd. Tien ml collagenase-oplossing werd toegevoegd en de weefselstukjes werden gedurende 30 à 45 minuten op 37°C verteerd. Na incubatie werden de weefselstukjes vijfmaal op en neer gepipetteerd met een glazen pasteurpipet om vervolgens de suspensie te filteren doorheen de twee filters (250 µm en 80 µm) die in dalende poriëgrootte geplaatst werden op een petrischaaltje. De lange tubuli (<100

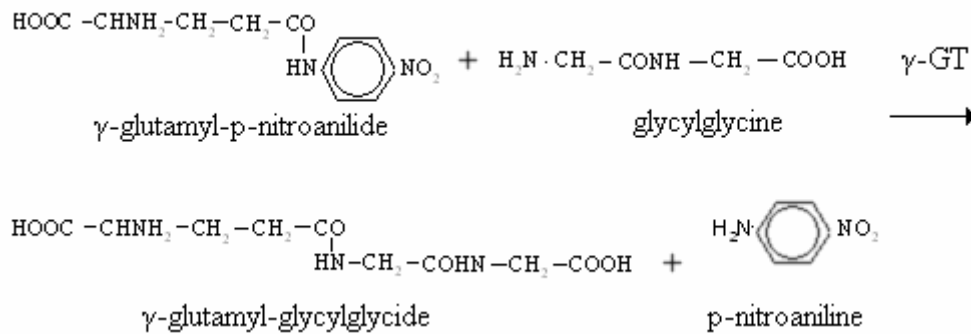
μm) werden opgevangen door de filter met een poriegrootte van $80 \mu\text{m}$. Deze filter werd omgedraaid op een nieuw petrischaaltje en in tegenovergestelde richting gespoeld met de albumine-oplossing. De suspensie met tubuli werd verzameld in een falcon-tube (50 ml) en gedurende 5 minuten gecentrifugeerd op 1000 rpm. Na verwijdering van het supernatant werden de tubuli gespoeld met 5 ml warm cultuurmedium (37°C) en gedurende 2 minuten gecentrifugeerd op 1000 rpm. Het supernatant werd opnieuw verwijderd en de tubuli werden geresuspendeerd in cultuurmedium (1 ml voor 6 filtertjes). Eerst werd $650 \mu\text{l}$ cultuurmedium aangebracht in de 24-wellplaat, hierop werd vervolgens een filtertje geplaatst waar $150 \mu\text{l}$ van de celsuspensie op aangebracht werd. De cellen werden geïncubeerd bij 37°C en 5% CO_2 en iedere 48 uur werd het cultuurmedium ververs. Na ongeveer 7 dagen werd er een monolaag van cellen gevormd.

Dezelfde isolatie- en zuiveringsprocedures die gebruikt werden voor het maken van primaire culturen werden gebruikt om suspensies van vers geïsoleerde proximale tubuli te verkrijgen.

13 γ -glutamyltransferase assay

γ -glutamyltransferase (γ -GT) is een enzyme dat teruggevonden wordt in weefsels zoals nier, pancreas, lever, darm, long, milt, borstklier, schildklier, beenmerg en lens. De hoogste activiteit is echter aanwezig in de brush border van proximale tubuli van de nier. De fysiologische functie van γ -GT is niet gekend, maar mogelijk is er een associatie met het glutathionemetabolisme. Gezien de specifieke localisatie van γ -GT t.h.v. de proximale tubulus, kan een bepaling van het enzyme gebruikt worden om de primaire celculturen te karakteriseren op hun proximaal fenotype.

γ -GT is een carboxypeptidase dat de transfer katalyseert van C-terminale γ -glutamylgroepen van peptiden of peptide-achtige componenten naar een ander acceptormolecule. De specificiteit wordt vooral beperkt tot het γ -glutamyldeel. Het overige deel van het substraatmolecule beïnvloedt enkel de snelheid van de reactie. De reactie, waarin γ -glutamyl-para-nitroanilide (kleurloos) fungeert als substraat en glycyglycine als acceptor (fig. 8) ziet er als volgt uit (56):



Figuur 8: Reactiemechanisme van γ -GT

Het substraatresidue, p-nitroaniline (geel), heeft een absorptiemaximum bij 405 nm. De γ -GT activiteit is proportioneel aan de hoeveelheid van p-nitroaniline die vrijgelaten wordt.

Toevoeging van magnesiumionen aan de reactie begunstigt de oplosbaarheid van het substraat, maar heeft geen effect op de activiteit van γ -GT.

13.1 Materialen

- Spectrofotometer (LKB BIOCHROM, NovaspecII)
- Cuvettes (1 ml) (dispolabKartell, 1941 PMMA microcuvettes)
- L- γ -glutamyl-p-nitroanilide (MG 267,2 g/mol) (Sigma, Bornem, België)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (MG 203,31 g/mol) (Acros Organics, Geel, België)
- TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethaan (MG 121,14 g/mol) (Acros Organics, Geel, België)
- Glycylglycine (MG 132,12 g/mol) (Sigma, Bornem, België)
- HCl (0,1 M) (Acros Organics, Geel, België)
- NaOH (0,1 M) (Sigma, Bornem, België)
- P-nitroaniline (MW 138,1 g/mol) (Sigma, Bornem, België)
- MilliQ- H_2O

Reactiemengsel (3 ml)

- 0,05 M TRIS (605,7 mg per 100 ml MilliQ- H_2O)
- 0,16 M Glycylglycine (21 mg per 1 ml TRIS 0,05 M)
- 0,016 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3,3 mg per 1 ml TRIS 0,05 M)
- 120 mg % L- γ -glutamyl-p-nitroanilide

1/3 volume van glycylglycine werd gemengd met 1/3 volume $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 1/3 volume TRIS. Hieraan werd 3,6 mg γ -glutamyl-p-nitroanilide toegevoegd. Het resulterende mengsel werd met 0,1 M HCl of 0,1 M NaOH op pH 8,2 gebracht. Dit is immers het beschreven pH-optimum voor γ -glutamyl-p-nitroanilide.

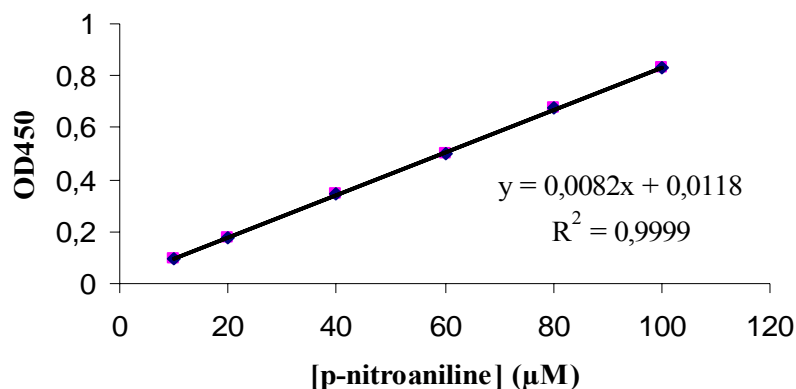
13.1.1 Standaardcurve voor p-nitroaniline

Om een standaardcurve voor p-nitroaniline te maken, werd eerst een stockoplossing van 1 mM p-nitroaniline in 0,05 M TRIS bereid. Hiervoor werd 6,905 mg p-nitroaniline afgewogen en opgelost in 50 ml TRIS 0,05 M. Verschillende hoeveelheden van deze stockoplossing werden vervolgens gemengd met TRIS 0,05 M volgens onderstaande tabel.

Tabel 1: Samenstelling van de standaardreeks voor p-nitroaniline

[p-nitroaniline]	Stockoplossing	TRIS (0,05M)	Totaal
100 μM	100 μl	900 μl	1 ml
80 μM	80 μl	920 μl	1 ml
60 μM	40 μl	940 μl	1 ml
40 μM	40 μl	960 μl	1 ml
20 μM	20 μl	980 μl	1 ml
10 μM	10 μl	990 μl	1 ml
Blanco	0 μl	1000 μl	1 ml

De juiste hoeveelheden werden in een cuvette gepipeteerd en de absorptie werd spectrofotometrisch bepaald bij 405 nm (in duplo). Met de blanco (0,05 M TRIS) werd gestandaardiseerd bij 405 nm. De ijkcurve (fig. 9) werd opgesteld door de gemiddelden van de bekomen absorptiewaarden weer te geven in functie van de gekende concentraties van p-nitroaniline.



Figuur 9: Ijkcurve van γ -GT

13.2 Methode

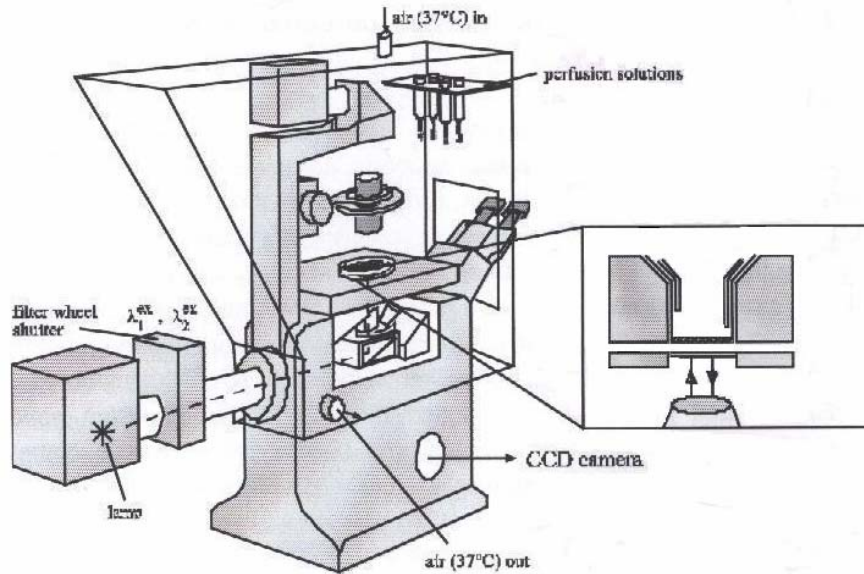
Van ieder filtertje werd het medium apicaal verwijderd, aangezien γ -GT zich bevindt in de brush border van de proximale tubuluscellen. Na toevoeging van het reactiemengsel werd vervolgens gedurende 10 tot 20 minuten geïncubeerd op 37°C. Na de incubatieperiode werd het reactiemengsel in een cuvette gebracht. 800 μ l TRIS 0,05 M werd toegevoegd om de reactie te stoppen en de absorptie werd met behulp van een spectrofotometer bij 405 nm gemeten tegenover een blanco (1 ml TRIS 0,05 M). De bekomen absorptiewaarden van de onbekende stalen werden met behulp van de vergelijking van de ijklijn omgerekend naar concentraties van p-nitroaniline (fig. 9)

De activiteit van γ -GT is afhankelijk van het aantal cellen in de primaire cultuur, wat varieert tussen de verschillende culturen. De waarden bekomen met de γ -GT assay moeten bijgevolg gestandaardiseerd worden voor de hoeveelheid cellen in de cultuur. Aangezien de proteïneconcentratie van een afzonderlijke cultuur een maat is voor het aantal cellen, dient deze bepaald te worden om de gemeten waarden van γ -GT activiteit onderling te kunnen vergelijken. De proteïneconcentratie in een primaire cultuur van proximale tubuluscellen werd reeds eerder bepaald door middel van de Bradford assay (Terry S., ongepubliceerde resultaten). De uiteindelijke waarden zijn een maat voor de aanwezigheid van γ -GT in de primaire culturen van proximale tubuluscellen.

14 Fluorescentiemicroscopie

14.1 Algemene procedure

De filtertjes met de confluente primaire culturen of de met collageen (Sigma, Type IV from human placenta) gecoate dekglasjes met vers geïsoleerde proximale tubuli werden gemonteerd in het daarvoor bestemde meetkamertje. Het houdertje werd geplaatst op de meettafel van een omgekeerde epifluorescentiemicroscop Nikon TMD35 (Tokio, Japan) (fig. 10). Een transparante box, waarin de lucht op 37°C werd gehouden door constante ventilatie via een extern circuit, omgeeft de meettafel van de microscoop.

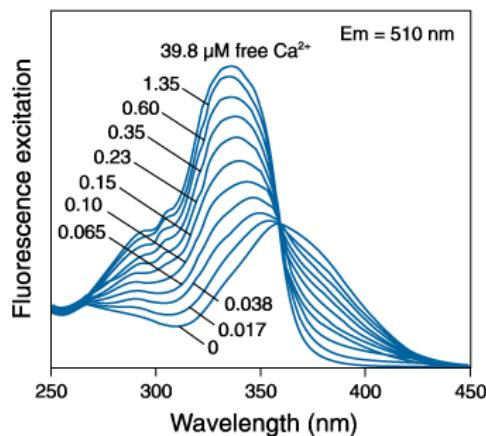


Figuur 10: De Nikon-opstelling voor fluorescentiemetingen van $[Ca^{2+}]_i$.

Na het meten van de achtergrondsignalen, werden de cellen (in het geval van de filtertjes, enkel aan de apicale zijde) opgeladen met de fluorescerende probe. Na het opladen werden de cellen 3 maal gewassen met Ringeroplossing om de niet-opgenomen probe te verwijderen. Het excitatielicht werd geleverd door een XBO 75 W/2 OFR xenon lamp (Osram, Berlijn-Munchen, Duitsland). De excitatiefilters zaten in een computer-gestuurd lambda10-filterwiel (Sutter Instrument Company, Novato, USA) dat snelle omwisseling van de verschillende excitatiefilters toeliet. De optische filters en dichroïsche spiegels werden verkregen bij Chroma Technology (Brattleboro, USA). Het excitatielicht werd naar de cellen gericht via een dichroïsche spiegel en een Zeiss LD Achromplan objective (40X/0.6). Het fluorescentielicht werd verzameld door het objectief en werd doorheen de dichroïsche spiegel en een band-pass emissiefilter gestuurd naar een Quantix CCD camera (Photometrix, Tucson, Arizona, USA). Deze camera is uitgerust met een Kodak KAF 1400 CCD (grade 2, MPP) met 849 x 609 pixels en wordt met een thermo-elektrische koeler afgekoeld tot een temperatuur van $-25^{\circ}C$. Het verkrijgen van een serie van beelden werd gecontroleerd door een 'huisgemaakt' computerprogramma dat gebaseerd is op 'V for Windows' software (Digital Optics, Auckland, New Zealand). Om bleking van de fluorescente probe en lichtschade bij de cellen te vermijden, werd de belichting beperkt tot periodes waarin er effectief beelden werden genomen. De signalen werden verkregen door het spatiaal integreren van pixels (3x3). Het achtergrondsignaal werd automatisch afgetrokken van elk beeld (pixel voor pixel).

14.2 Metingen van intracellulaire calciumconcentraties

De intracellulaire calciumconcentraties werden gemeten met de fluorescente probe Fura-2 (Molecular Probes, Eugene OR, USA). De cellen werden gedurende 1 uur (voor zowel de primaire culturen als de vers geïsoleerde tubuli) opgeladen met 10 μM (van een 5mM stockoplossing in DMSO) Fura-2 AM (acetoxy methylester) bij 37°C. Deze estervorm is niet gevoelig voor Ca^{2+} -ionen en kan passief doorheen celmembranen diffunderen. In de cel splitsen cytosolaire esterases de esterzijk groepen van het Fura-2 molecule af. Deze de-esterificatie resulteert in een Ca^{2+} -gevoelige indicator die bovendien negatief geladen is waardoor Fura-2 moeilijk doorheen de celmembraan kan diffunderen. Ook gaat de hydrolyse van het veresterde Fura-2 molecule gepaard met de aanmaak van potentieel toxische bijproducten, namelijk formaldehyde en acetaat.



Figuur 11: Fluorescentie-excitatiespectra van Fura-2 in bufferoplossingen van 0 tot 39,8 μM vrij Ca^{2+} (*Molecular Probes, Handbook*)

Fura-2 is een ratiometrische probe. De verhouding (R) van de fluorescentie-intensiteiten van excitatie bij 340 nm (F_{340}) tot die bij 380 nm (F_{380}) is een maat voor de intracellulaire calciumconcentratie. Door binding aan Ca^{2+} veranderen de fluorescentie-eigenschappen van de probe. Indien $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stijgt, verschuift het excitatiespectrum van Fura-2 naar een kortere golflengte. De vrije en gebonden vorm van Fura-2 hebben immers een eigen excitatiespectrum. Het excitatiespectrum van de vrije vorm heeft een maximum rond 380 nm, terwijl het maximum voor de gebonden vorm rond 340 nm ligt. De piek van het emissiespectrum ligt bij beide vormen van Fura-2 bij 510 nm (fig. 11). Ratiometrische metingen reduceren of elimineren de variaties in het fluorescentiesignaal te wijten aan microscopische parameters en artefacten aangezien ze beide metingen in dezelfde mate zouden beïnvloeden. Dus door gebruik te maken van de verhouding in plaats van absolute

metingen hebben factoren zoals het weglekken van de probe uit de cel en fotobleking geen invloed op de gemeten intracellulaire calciumconcentratie.

De excitatiegolflengtes werden geselecteerd met behulp van 340/10 nm en 380/10 nm 'bandpass' excitatiefilters. Voor het emissielicht werden een dichroïsche spiegel type 72100 (> 500 nm 'long pass' filter) en een 535/50 nm 'bandpass' emissiefilter gebruikt. De blootstellingsduur per beeld was 3 seconden. Aan het einde van ieder experiment werden de bekomen Fura-2 ratio's in vivo gekalibreerd. De vergelijking van Grynkiewicz et al. (57) werd gebruikt om de intensiteitsratio's te relateren aan $[Ca^{2+}]_i$.

$$[Ca^{2+}]_i = K_d * R_{bf} * [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)]$$

K_d is de dissociatieconstante van Fura-2 voor Ca^{2+} (135 nM) (58); R_{bf} is de verhouding van de maximale fluorescentie-intensiteit bij excitatie op 380 nm (incubatie in R_{min} oplossing, zie *Oplossingen en reagentia*) tot de minimale fluorescentie-intensiteit (incubatie in R_{max} oplossing, zie *Oplossingen en reagentia*) indien geëxciteerd wordt bij 380 nm. R is de F_{340}/F_{380} fluorescentieratio. R_{max} en R_{min} zijn de F_{340}/F_{380} ratio's bekomen bij incubatie in respectievelijk R_{max} en R_{min} oplossingen. R_{max} werd verkregen door de cellen te permeabiliseren voor Ca^{2+} met de Ca^{2+} -ionofoor ionomycine die toegevoegd werd aan de Ringer met hoge Ca^{2+} (zie *Oplossingen en reagentia*). De intracellulaire en extracellulaire Ca^{2+} concentraties komen op deze manier in evenwicht met elkaar. Om R_{min} te verkrijgen werden de cellen vervolgens geïncubeerd met een Ca^{2+} -vrije oplossing (zie *Oplossingen en reagentia*), waaraan 10 μ M ionomycine, 10 μ M BAPTA-AM en 10 mM EGTA werden toegevoegd. De intracellulaire en extracellulaire vrije Ca^{2+} -ionen werden respectievelijk gebonden door BAPTA-AM en EGTA.

14.3 Oplossingen en reagentia

De samenstelling van de experimentele zoutoplossing (Ringer) waarin de primaire culturen van proximale tubuluscellen en de vers geïsoleerde tubuli gebracht werden, staat in tabel 2 (in mM).

Tabel 2: Samenstellingen van de oplossingen

	Ringer	Ringer met hoge Ca^{2+} (R_{\max})	Ringer zonder Ca^{2+} (R_{\min})
NaCl	138	138	138
KCl	5,33	5,33	5,33
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,41	0,41	0,41
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,26	5	
KH_2PO_4	0,44	0,44	0,44
MgCl_2	0,5	0,5	0,5
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,3	0,3	0,3
NaHCO_3	4	4	4
HEPES	10	10	10
L-Glutamine	4	4	4
D-Glucose	5,6	5,6	5,6
Osmolaliteit	325 mOsm/kg H_2O met mannitol		
pH	7,4 met TRIS-base		

Angiotensine II en bradykinine (allen Sigma, Bornem, België) werden in verschillende concentraties gebruikt (stockoplossing in DMSO (Acros Organics, Geel, België)), opgelost in Ringer. De toediening van de hormonen gebeurde aan de apicale én basolaterale zijde. Een stockoplossing van CdCl_2 (Sigma) werd gemaakt in CM.

De calibratie-oplossing voor de bepaling van R_{\max} bevat 990 μl Ringer met hoge Ca^{2+} en 10 μl ionomycine (Sigma) vanuit een stockoplossing van 1 mM in ethanol. De calibratie-oplossing voor R_{\min} bevat 970 μl Ringer zonder Ca^{2+} , 10 μl ionomycine (Sigma) vanuit een stockoplossing van 1 mM in ethanol, 10 μl BAPTA-AM (Molecular Probes, Eugene OR, USA) vanuit een stockoplossing van 1 mM in Ca^{2+} -vrije Ringer en 10 μl EGTA vanuit een stockoplossing van 1 mM in 3 M TRIS.

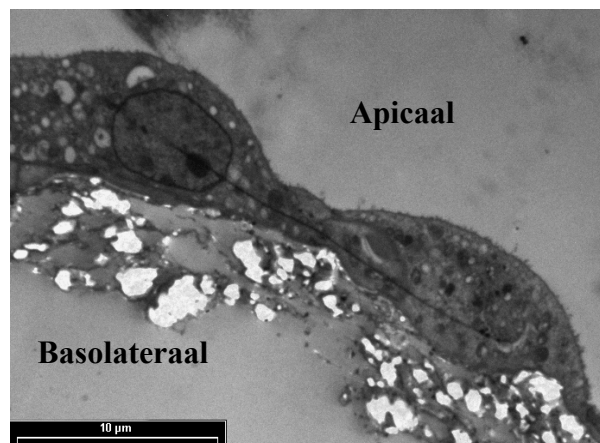
RESULTATEN

15 Primaire cultuur van proximale tubuluscellen van de muis

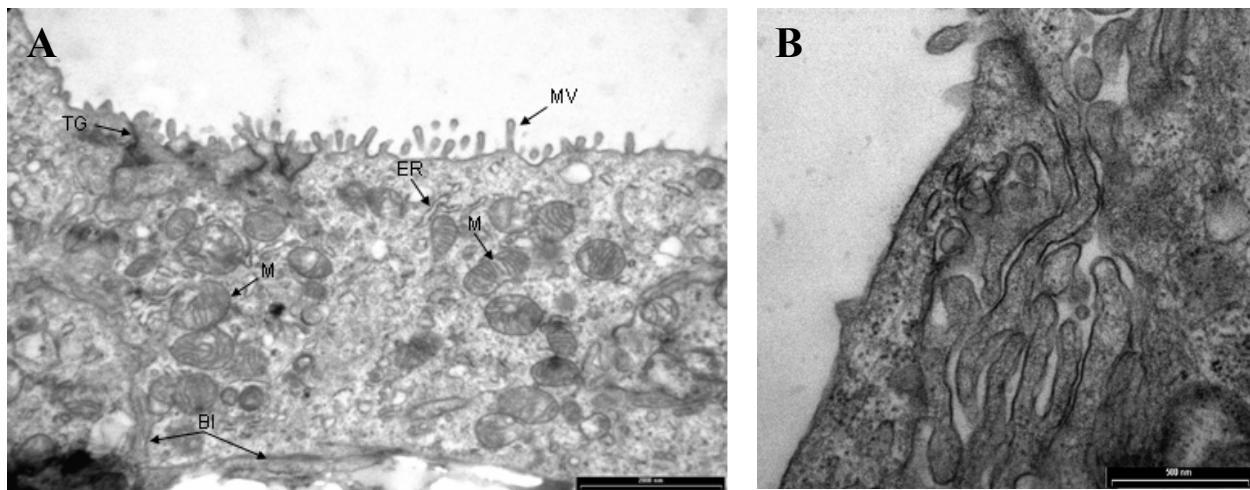
Lichtmicroscopie en elektronenmicroscopie werden gebruikt om de morfologie van proximale tubuluscellen in cultuur te evalueren.

Op een lichtmicroscopisch beeld kunnen polygonale cellen waargenomen worden die een confluenta laag (na ongeveer 7 dagen) vormen met een kasseisteenachtig uitzicht (fig.15). Dome-vorming kan gezien worden, hoewel het duidelijker is wanneer de cellen rechtstreeks op de well-plaat groeien.

Een elektronenmicroscopisch beeld toont dat de cellen groeien als een monolaag op de gebruikte filtertjes (fig. 12). De verspreiding van talrijke organellen in de cel zoals het ER en de mitochondriën wordt eveneens duidelijk. De cellen aanwezig in de monolaag hebben een gepolariseerd karakter. Aan de apicale kant zijn microvilli aanwezig, die samen met de basolaterale membraanplooiën zorgen voor oppervlaktevergroting van de cel. *Tight junctions* tussen naburige epitheliale cellen zijn eveneens apicaal aanwezig (fig. 13). Het basolaterale oppervlak van de cellen is vastgehecht aan het filtertje terwijl het lumenale membraan rechtstreeks in contact staat met het cultuurmedium (fig. 12).



Figuur 12: Transmissie elektronenmicroscopie (TEM) toont dat proximale tubuluscellen in cultuur groeien als een monolaag op met collageen gecoatete membraanfilters. (Met dank aan Terryn, S.)



Figuur 13: Aan de apicale zijde van proximale tubuliscellen in cultuur zijn microvilli (MV) en tight junctions (TJ) aanwezig. Basolaterale invouwingen (BI) en talrijke celorganellen, zoals endoplasmatisch reticulum (ER) en mitochondriën (M) kunnen onderscheiden worden (A).

Detailbeeld van basolaterale invouwingen (B). (Met dank aan Terryn, S.)

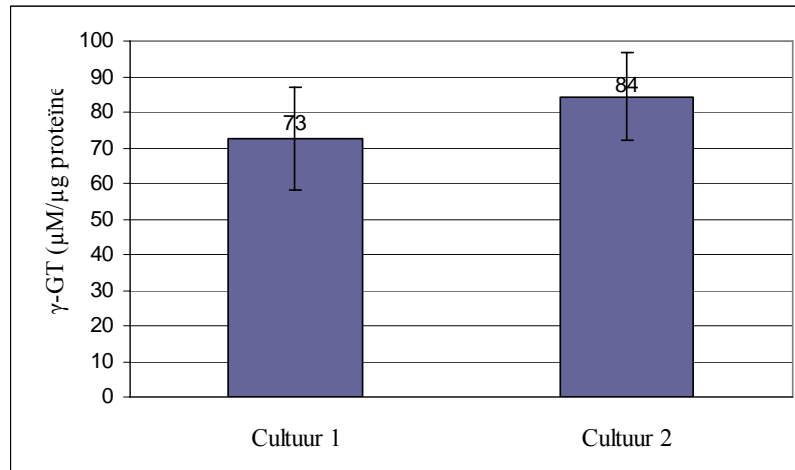
16 γ -glutamyltransferase assay

Door het uitvoeren van de γ -glutamyltransferase assay werd nagegaan of een primaire cultuur werkelijk samengesteld was uit proximale tubuli. Proximale tubuliscellen worden immers gekarakteriseerd door de aanwezigheid van γ -glutamyltransferase in het brush bordermembraan. In distale tubuli daarentegen wordt het enzyme in mindere mate aangetroffen, wat erop wijst dat γ -GT een merker is voor de aanwezigheid van proximale tubuli. Deze assay deed dienst als controle dat de techniek van het maken van primaire culturen correct werd uitgevoerd.

Om de waarden bekomen met de γ -GT assay te standaardiseren voor de hoeveelheid cellen in de cultuur werd de proteïneconcentratie bepaald door middel van de Bradford assay (Terryn S., ongepubliceerde resultaten). Het gemiddelde proteïnegehalte in een cultuur bedroeg 0,433 μg .

Tabel 3: γ -glutamyltransferase assay

	Filter	OD405	μM	$\mu\text{M}/\mu\text{g}$ proteïne
Cultuur 1	1	0,179	20,39	46,69
	2	0,191	21,85	50,05
	3	0,395	46,73	107,02
	4	0,322	37,83	86,63
Cultuur 2	1	0,343	40,38	93,32
	2	0,459	54,52	126,02
	3	0,219	25,26	58,37
	4	0,301	35,26	81,49
	5	0,235	27,21	62,88

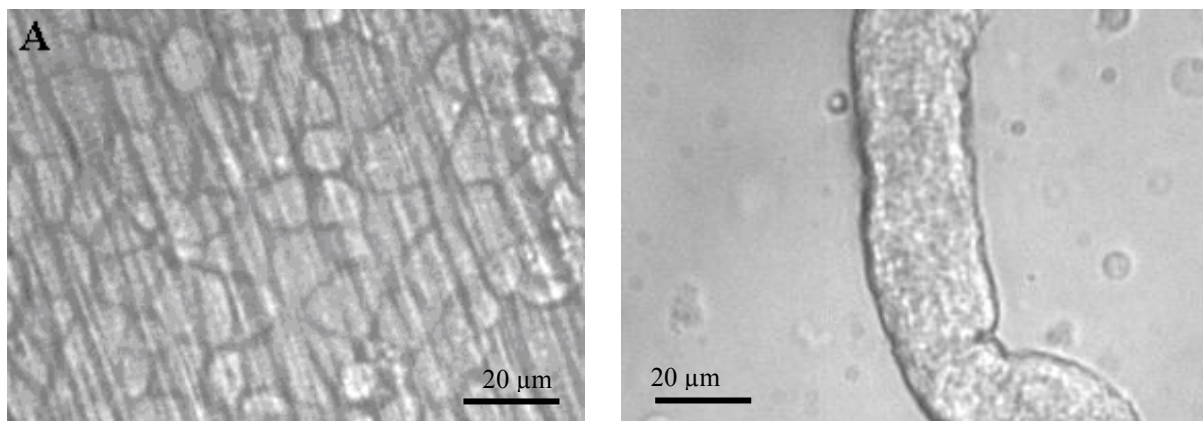


Figuur 14: Aanwezigheid van γ -GT in primaire culturen van proximale tubulussellen. De γ -GT assay werd uitgevoerd op twee primaire culturen, bestaande uit 4 of 5 filtertjes. De gemiddelden van de waarden in tabel 3 worden weergegeven.

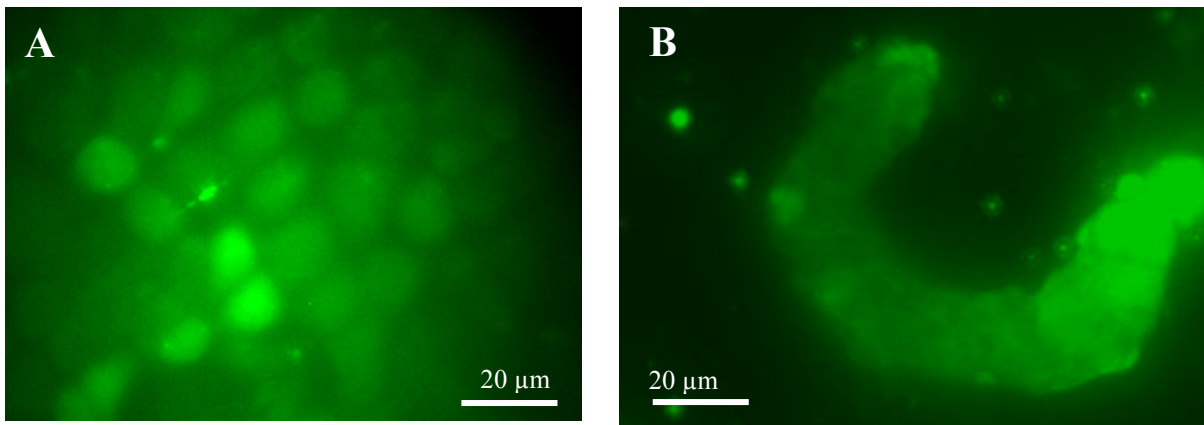
De resultaten van de γ -GT assay tonen dat γ -GT activiteit aanwezig is in de primaire culturen (tabel 3, fig. 14). Na het karakteriseren van de primaire culturen op hun proximaal fenotype kon gestart worden met fluorescentiemicroscopie.

17 Fluorescentiemicroscopie

De Ca^{2+} -homeostase van de primaire culturen en de vers geïsoleerde proximale tubuli (PT) werd bepaald met behulp van fluorescentiemicroscopie. Vooraleer de cellen opgeladen werden met de fluorescente probe Fura-2/AM, werd een transmissiebeeld (*brightfield*) genomen (fig. 15) en werden de achtergrondsignalen gemeten die vervolgens automatisch van de fluorescentiebeelden werden afgetrokken (fig. 16).



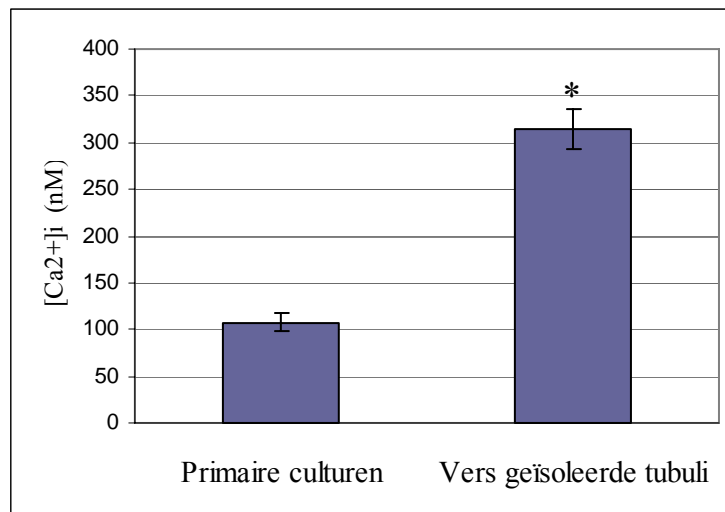
Figuur 15: Transmissiebeeld (40x objectief) van een primaire cultuur (A) en van een vers geïsoleerde proximale tubulus (B).



Figuur 16: Fluorescentiebeeld (40x objectief) van een primaire cultuur (A) en van een vers geïsoleerde proximale tubulus bij excitatie op 380 nm, verkregen na opladen met Fura-2/AM (B).

17.1 Basale $[Ca^{2+}]_i$ in primaire culturen versus vers geïsoleerde proximale tubuli

In de primaire culturen werd een basale $[Ca^{2+}]_i$ geregistreerd van 107 nM, terwijl in de vers geïsoleerde tubuli een waarde van 314 nM werd teruggevonden (fig. 17).



Figuur 17: Basale $[Ca^{2+}]_i$ in primaire culturen (N = 12) versus vers geïsoleerde proximale tubuli (N = 6). De waarden in de studie zijn gemiddelden \pm SEM. Data werden geanalyseerd door middel van een tweezijdige ongepaarde t-test. Significantie (*) werd gesteld op $p < 0,05$.

17.2 $[Ca^{2+}]_i$ in functie van hormoonstimulatie

De bedoeling was om na te gaan of de primaire culturen in die mate gedifferentieerd zijn dat receptoren voor de hormonen bradykinine en angiotensine II aanwezig zijn. Van beide hormonen is geweten dat ze een stijging in $[Ca^{2+}]_i$ veroorzaken. Door de Ca^{2+} -respons te

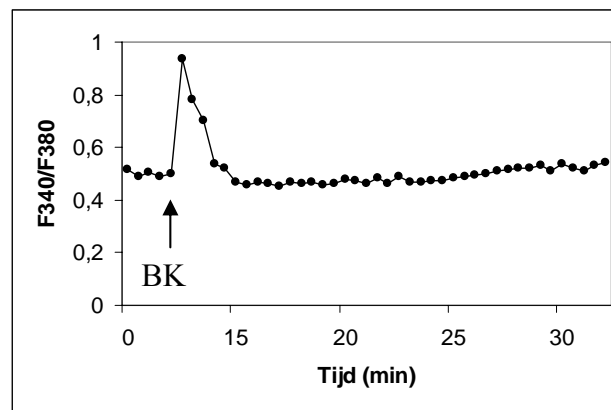
bestuderen na stimulatie met de hormonen kon dus de aanwezigheid van de receptoren uitgetest worden.

Ook bij vers geïsoleerde tubuli werd gezocht naar het effect van hormoonstimulatie op de basale $[Ca^{2+}]_i$, om vervolgens een vergelijking te maken met de Ca^{2+} -respons bij primaire culturen.

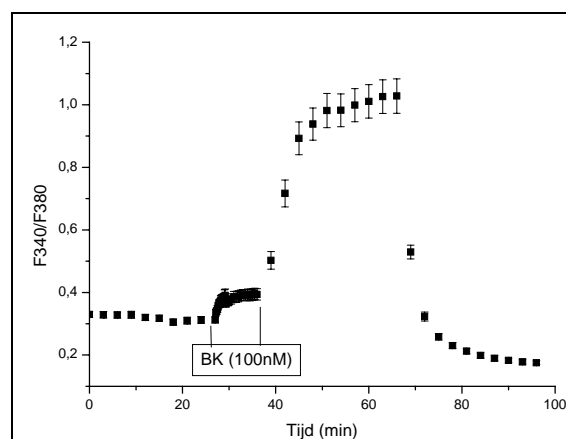
17.2.1 Effect van hormoonstimulatie in primaire culturen

Bradykinine

Toevoeging van BK aan het incubatiemedium van de cellen resulteerde in een snelle, transiënte stijging in $[Ca^{2+}]_i$, die gevolgd werd door een trage stijging. De stijging in het F_{340}/F_{380} -signaal weerspiegelt de gestegen $[Ca^{2+}]_i$ (fig. 18). De snelle, transiënte stijging wordt niet in ieder experiment waargenomen (fig. 19).

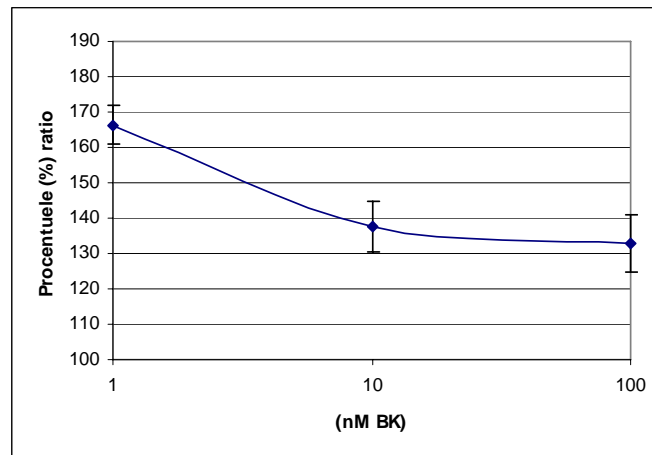


Figuur 18: Representatieve tracing van de ratio (F_{340}/F_{380} -signaal) in functie van de tijd (min) bij BK-stimulatie (100 nM, apicale + basolaterale toediening).



Figuur 19: Verloop van de ratio (F_{340}/F_{380} -signaal) in functie van de tijd (min) bij BK-stimulatie (100 nM, apicale + basolaterale toediening). De waarden zijn gemiddelden \pm SEM. N = 3. Aan het einde van het experiment werden de bekomen ratio's in vivo gekalibreerd door toediening van respectievelijk de R_{max} -oplossing en de R_{min} -oplossing.

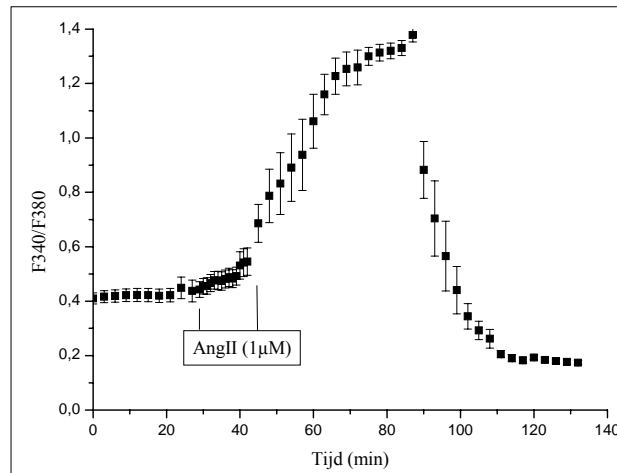
Om na te gaan welke fysiologische concentraties van BK de grootste Ca^{2+} -respons uitlokken, werden verschillende dosissen van BK (1 nM, 10 nM en 100 nM) toegepast. De dosisresponscurve van BK geeft de procentuele verandering van de F_{340}/F_{380} -ratio weer ten opzichte van de basale ratio. (fig. 20). Een concentratie van 1 nM BK deed de ratio stijgen met 67% terwijl 10 nM en 100 nM BK resulteerden in kleinere responsen van respectievelijk 36% en 26%.



Figuur 20: Dosisresponscurve van BK weergegeven als procentuele veranderingen van de F_{340}/F_{380} -ratio ten opzichte van de basale ratio. De basale ratio werd gelijkgesteld aan 100%. Concentraties van 1 nM, 10 nM en 100 nM BK werden toegevoegd aan de Ringer. Omdat niet ieder experiment beëindigd kon worden met een kalibratie, worden de data weergegeven in ratio's. De waarden zijn gemiddelden \pm SEM. $N = 3$. De data werden geanalyseerd door middel van een tweezijdige ongepaarde t-test en werden niet significant bevonden ($p > 0,05$).

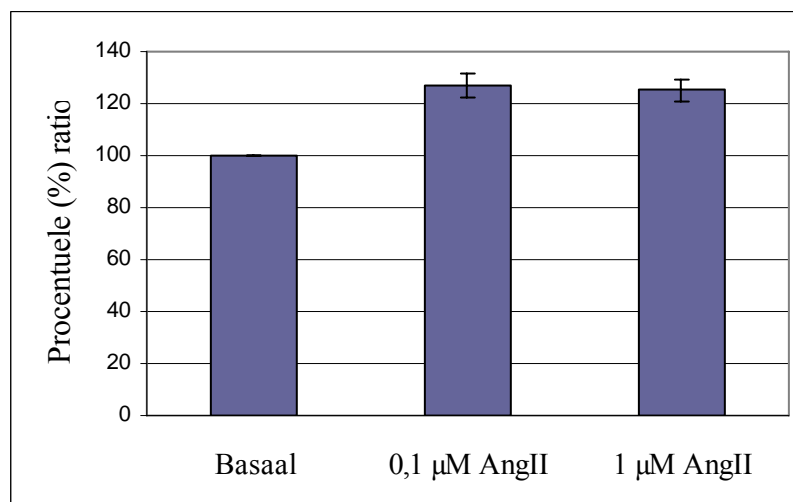
AngiotensineII

Om het effect van AngII op de intracellulaire Ca^{2+} -homeostase te bestuderen, werd AngII toegevoegd aan het incubatiemedium. Het verloop van het F_{340}/F_{380} -signaal toont een langzame stijging, die nadien overgaat in een plateau (fig. 21).



Figuur 21: Verloop van de F_{340}/F_{380} -ratio in functie van de tijd bij AngII-stimulatie ($1 \mu\text{M}$, apicale en basolaterale toediening). De waarden zijn gemiddelden \pm SEM. $N = 3$. Aan het einde van het experiment werden de bekomen ratio's in vivo gekalibreerd door toediening van respectievelijk de R_{max} -oplossing en de R_{min} -oplossing.

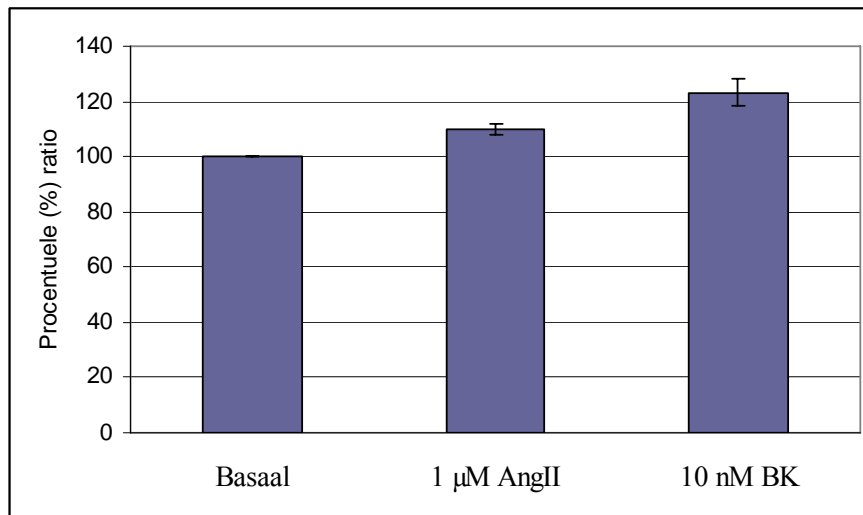
Toediening van verschillende dosissen van AngII ($0,1 \mu\text{M}$ of $1 \mu\text{M}$) resulteerde in vergelijkbare stijgingen in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Aangezien niet elk experiment beëindigd kon worden met een kalibratie, worden de data weergegeven als ratio's (F_{340}/F_{380}). Als de basale ratio gelijk wordt gesteld aan 100%, dan wordt bij $0,1 \mu\text{M}$ AngII een stijging van 27% waargenomen ten opzichte van de basale waarde, terwijl dit bij $1 \mu\text{M}$ AngII 25% is (fig. 22).



Figuur 22: Procentuele verandering van de F_{340}/F_{380} -ratio ten opzichte van de basale ratio in respons op AngII-stimulatie ($0,1 \mu\text{M}$ en $1 \mu\text{M}$ AngII). De basale ratio werd gelijkgesteld aan 100%. De waarden zijn gemiddelden \pm SEM. $N = 3$. De data werden geanalyseerd door middel van een tweezijdige ongepaarde t-test en werden niet significant bevonden ($p > 0,05$).

17.2.2 Effect van hormoonstimulatie in vers geïsoleerde proximale tubuli

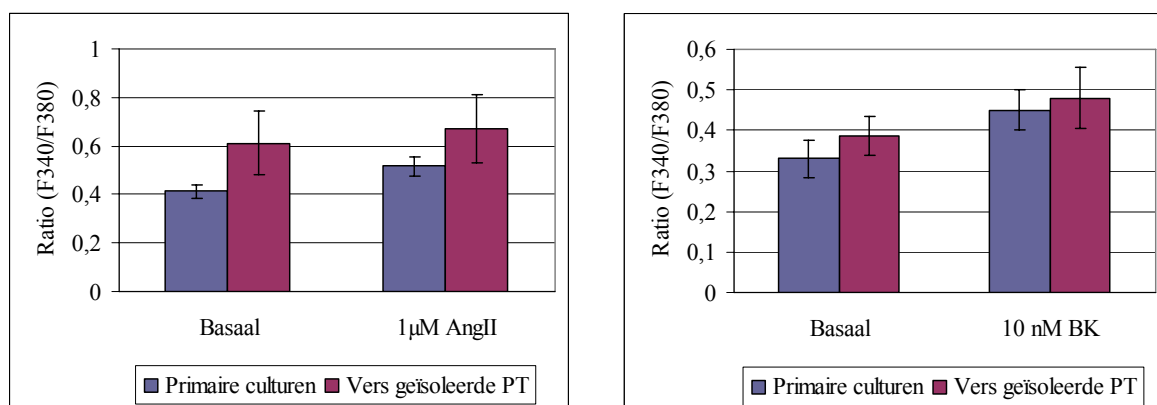
Het tweede in vitro systeem waarin de effecten van BK en AngII werden getest, waren de vers geïsoleerde proximale tubuli. De veranderingen in $[Ca^{2+}]_i$ ten opzichte van de basale waarde worden weergegeven als procentuele veranderingen van de F_{340}/F_{380} -ratio. Een concentratie van 1 μ M AngII veroorzaakte een zeer lichte stijging van 10%. De stijging (31%) waargenomen bij 10 nM BK was meer uitgesproken (fig. 23).



Figuur 23: Procentuele verandering van de F_{340}/F_{380} -ratio ten opzichte van de basale ratio in respons op AngII- en BK-stimulatie (respectievelijk 1 μ M en 10 nM). De waarden zijn gemiddelden \pm SEM. N = 3. De basale ratio werd gelijkgesteld aan 100%. De data werden geanalyseerd door middel van een tweezijdige ongepaarde t-test en werden niet significant bevonden ($p > 0,05$).

17.3 Vergelijking tussen primaire culturen en vers geïsoleerde proximale tubuli

De Ca^{2+} -responsen bij hormoonstimulatie werden vergeleken tussen primaire culturen en vers geïsoleerde proximale tubuli. In het geval van 1 μ M AngII steeg de ratio in de primaire culturen met 25% ten opzichte van de basale waarde. Bij de vers geïsoleerde PT bedroeg deze stijging slechts 10%, wat wilt zeggen dat de respons in de primaire culturen 15% hoger was dan in vers geïsoleerde PT. Bij 10 nM BK werd in de primaire culturen een stijging van 37% waargenomen ten opzichte van de basale ratio. In vers geïsoleerde PT daarentegen was er een stijging van 23% ten opzichte van basaal. De respons na de BK-stimulatie was dus 15% hoger in de primaire culturen dan in de vers geïsoleerde PT (fig. 24).



Figuur 24: Ca²⁺-responsen bij AngII- en BK-stimulatie in primaire culturen versus vers geïsoleerde proximale tubuli. De waarden worden weergegeven als ratio's en zijn gemiddelden ± SEM. N = 3. De data werden geanalyseerd door middel van een tweezijdige ongepaarde t-test en werden niet significant bevonden ($p > 0,05$).

17.4 Effect van Cd op de intracellulaire Ca²⁺-homeostase

Om na te gaan of Cd²⁺ interfereert met de Ca²⁺-homeostase in proximale tubuluscellen werden de primaire culturen gedurende 24 uur apicaal en basolateraal blootgesteld aan CdCl₂ (100 nM of 1 µM). Een daling in [Ca²⁺]_i ten opzichte van de controle was waarneembaar na blootstelling aan beide concentraties (tabel 4). De [Ca²⁺]_i in controle-omstandigheden wordt in tabel 4 weergegeven als een gemiddelde waarde van de controle-experimenten (N = 12).

Tabel 4: Basale [Ca²⁺]_i (nM) in primaire culturen na 24 uur blootstelling aan CdCl₂ (100 nM of 1 µM). De data werden geanalyseerd door middel van niet-parametrische ANOVA en werden niet significant bevonden ($p > 0,05$).

	Controle	100 nM CdCl ₂	1 µM CdCl ₂
[Ca ²⁺] _i (nM)	107 ± 10 (N = 12)	68 en 62 (N = 2)	70 ± 16 (N = 3)

18 Primaire cultuur van proximale tubuluscellen van de muis

Het bestuderen van de functies van de renale tubulus wordt bemoeilijkt door zijn complexiteit en de aanwezigheid van talrijke celtypen. In deze thesis ging de interesse uit naar proximale tubuluscellen, meer bepaald naar een cultuursysteem om de functies van deze cellen te bestuderen. Cellen in cultuur verliezen eerst hun oorspronkelijke gedifferentieerde functies, om daarna terug te streven naar een zo hoog mogelijke graad van differentiatie. Primaire culturen vormen bijgevolg een nuttig in vitro systeem voor de studie van hun corresponderende in vivo functies. Cellijnen daarentegen worden beperkt door verlies van gedifferentieerde functies, wat bijgevolg de extrapolatie naar de in vivo situatie onbetrouwbaar maakt.

Naast de mogelijkheid om proximale tubulaire functies te bestuderen in een cultuursysteem laat zulk een systeem toe de cellulaire mechanismen van nefrotoxiciteit te bestuderen. In deze thesis werden het effect van cadmium op de intracellulaire Ca^{2+} -homeostase onderzocht.

Primaire culturen van proximale tubuluscellen vinden hun oorsprong in een suspensie van PT fragmenten. Deze suspensie werd verkregen door de cortex, die verrijkt is aan PT, te scheiden van de medulla. Digestie van het corticale bindweefsel met collagenase en daaropvolgende filtratie resulteerde in een redelijk zuivere suspensie van proximale tubuli, ontdaan van glomeruli en andere tubulusfragmenten.

De celcultuurcondities, waaronder de samenstelling van het cultuurmedium, zijn bepalend voor de ontwikkeling van de primaire cultuur. Medium met de juiste groei- en differentiatiefactoren, zoals transferrine, insuline en hydrocortisone, en zonder toevoeging van fenolrood lijkt optimaal te zijn voor de groei van proximale tubuluscellen (54, 59). Nierepitheelcellen afkomstig van verschillende nefronsegmenten groeien immers anders in respons op verschillende hormonen en groeifactoren (59).

Ook het weefselcultuursubstraat is een belangrijke factor die beperkingen stelt aan het succesvol in cultuur brengen van proximale tubuluscellen. In vivo hechten deze cellen op een zeer precieze manier vast aan de extracellulaire matrix om normale weefselintegriteit te behouden. In vitro moeten ze gelijkaardig interageren met een substraat om te groeien en te functioneren. Collageen gecoate PTFE filtertjes voldeden aan de 'vereisten' van proximale tubuluscellen.

De culturen van proximale tubulaire cellen, gegroeid onder de juiste celcultuurcondities, vertonen morfologische kenmerken van het proximale nefron. Op een lichtmicroscopisch beeld is de confluent laag, gevormd van polygonale cellen, waarneembaar als een laag met een kasseisteenachtig uitzicht. Wanneer confluentie bereikt wordt, is ook dome-vorming aanwezig, kenmerkend voor transepitheliaal transport van opgeloste stoffen en water (60).

Transmissie elektronenmicroscopie onthulde de verspreiding van talrijke organellen, zoals mitochondriën en ER, wat aangeeft dat proximale tubulaire cellen in cultuur zeer metabool actief zijn, overeenkomstig met de in vivo situatie. Aan de apicale zijde kunnen *tight junctions* waargenomen worden, kenmerkend voor epitheliale cellen (60). Het membraan aan deze zijde is in vivo voorzien van een overvloedige brush border. De aanwezigheid van microvilli wordt bevestigd door de elektronenmicroscopische opname. De basolaterale membraanplooiën of invouwingen zijn karakteriserend voor nierepithelcellen (61).

De culturen groeien als een monolaag van gepolariseerde cellen met het basolaterale membraan vastgehecht aan het filtertje en het lumenale membraan in contact met het cultuurmedium. De bevindingen die gedaan werden in het beschreven cultuursysteem zijn in overeenstemming met eerdere beschrijvingen van primaire culturen van proximale tubuluscellen (60).

19 γ -glutamyltransferase assay

Het doel van de γ -GT assay was het nagaan van het proximale tubulaire karakter van de cellen. γ -GT is een enzyme, aanwezig in de brush border van proximale tubuluscellen en is dus een merker voor deze cellen (62). De resultaten van de γ -GT assay duiden op de aanwezigheid van het enzyme, wat de identiteit van de proximale tubuluscellen bevestigt. De geregistreerde waarden waren hoger dan deze in eerder beschreven literatuur (59).

Steunend op het feit dat γ -GT werd aangetoond in de primaire culturen werd aangenomen dat de techniek om proximale tubuluscellen in cultuur te brengen correct werd uitgevoerd. Wel kan het gebruikte protocol voor het maken van primaire culturen de aanwezigheid van andere celtypen in de cultuur niet uitsluiten. Het testen van de aanwezigheid van distale enzymen zou het niveau van contaminatie van de culturen aantonen. Maar de morfologische kenmerken van de culturen en de aanwezigheid van γ -GT wijzen in de richting van een cultuur die erg verrijkt is in proximale tubuluscellen.

20 Fluorescentiemicroscopie

20.1 Primaire culturen versus vers geïsoleerde proximale tubuli

Zoals eerder vermeld kunnen primaire culturen van proximale tubuluscellen gebruikt worden om in vitro hun corresponderende in vivo functies te bestuderen. Vers geïsoleerde tubuli staan echter nog dicht bij de in vivo situatie. Ze worden enkel uit hun weefselverband gehaald en hun gedifferentieerde functies zijn nog in hogere mate intact. Omdat het systeem dicht aansluit bij de in vivo situatie, is het systeem ook complexer, wat vertaald wordt in een aantal (praktische) moeilijkheden.

Onmiddellijk na de isolatieprocedure zijn de lumens van de proximale tubulaire fragmenten in een open toestand, maar na korte tijd klappen ze toe door reabsorptie van de lumenale vloeistof en is de apicale zijde niet meer toegankelijk voor het incubatiemedium. Enkel de basolaterale zijde wordt bijgevolg uniform blootgesteld aan het medium. De primaire culturen gegroeid op filtertjes kunnen daarentegen langs de apicale én basolaterale zijde benaderd worden.

Een van de meest belangrijke beperkingen van vers geïsoleerde proximale tubuli is hun beperkte levensduur in suspensie. Ze zijn in staat viabiliteit te behouden voor 2 à 3 uur wanneer ze geïncubeerd worden in een geschikt medium voorzien van nutriënten en zuurstof. Primaire culturen van proximale tubuluscellen kunnen daarentegen langer functioneel gehouden worden.

20.2 Basale $[Ca^{2+}]_i$ in primaire culturen versus vers geïsoleerde proximale tubuli

Voor de bepaling van de intracellulaire Ca^{2+} -concentratie werden de cellen opgeladen met de fluorescente probe Fura-2/AM. In de vers geïsoleerde proximale tubuli werd in basale omstandigheden een significant hogere $[Ca^{2+}]_i$ gemeten dan in de primaire culturen. Dit is in overeenstemming met bevindingen in eerdere studies (5, 6).

De mechanische stress die gepaard gaat met de isolatieprocedure is mogelijk een oorzaak van de hogere $[Ca^{2+}]_i$ in de vers geïsoleerde PT. De cellen in de primaire culturen daarentegen kunnen herstellen van de eventuele beschadigingen aangericht door stress-stimuli.

20.3 $[Ca^{2+}]_i$ in functie van hormoonstimulatie

Om na te gaan of AngII- en BK-receptoren aanwezig zijn in de primaire culturen werd de Ca^{2+} -respons bestudeerd na stimulatie met de betreffende hormonen. Een stijging van de basale $[Ca^{2+}]_i$ na hormoonstimulatie zou wijzen op de aanwezigheid van de receptoren,

aangezien geweten is dat beide hormonen een Ca^{2+} -stijging uitlokken. Het uiteindelijke doel was een verdere karakterisatie van de primaire culturen.

20.3.1 Effect van hormoonstimulatie in primaire culturen

Bradykinine

Stimulatie van de proximale tubulaire cellen met BK resulteerde in een snelle $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -stijging die transiënt van aard was. Deze snelle ‘piek’ werd gevolgd door een trage stijging. Eerdere studies, waarbij enkel acute effecten van BK werden bestudeerd, toonden een gelijkaardige snelle stijging (26, 27).

Een mogelijke verklaring voor de snelle respons is een onmiddellijke vrijlating van Ca^{2+} uit het ER bij stimulatie. De snelle terugkeer naar het basale niveau kan te wijten zijn aan de verwijdering van Ca^{2+} van het cytosol door opname in de mitochondriën en het ER, en extrusie via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -uitwisselaars en Ca^{2+} -ATPases in het plasmamembraan.

De val in de Ca^{2+} -inhoud van het ER vereist het hervullen van deze Ca^{2+} -opslagplaats. De koppeling van het ER aan de SOC's in het plasmamembraan zou een Ca^{2+} -instroom kunnen veroorzaken, wat een mogelijke verklaring biedt voor de trage $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -stijging.

In de meeste experimenten werd echter geen snelle $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -stijging waargenomen. Mogelijk is de tijdsresolutie van het meetsysteem een beperkende factor. Ook moet rekening gehouden worden met het feit dat BK manueel wordt toegevoegd aan het incubatiemedium van de cellen. Enige diffusietijd vooraleer het hormoon zijn receptor bereikt, kan noodzakelijk zijn. Deze diffusietijd verhindert mogelijk een snelle Ca^{2+} -stijging omdat de concentratie van het hormoon op eenzelfde plaats en tijdstip te laag is om een snelle respons te veroorzaken. Een ‘diffuus’ effect is dan het resultaat.

De trage Ca^{2+} -stijging werd wel in ieder experiment waargenomen. Om na te gaan welke fysiologische concentratie van BK de grootste stijging uitlokt, werden verschillende dosissen van BK (1 nM, 10 nM en 100 nM) toegepast. De dosisresponscurve toont dat bij 1 nM BK de grootste stijging wordt veroorzaakt. Hoe hoger de concentratie van BK (10 nM en 100 nM), hoe kleiner de respons. Aboolian en Nord (1988) ondersteunen met hun studie de waarneming dat 1 nM BK het meest effectief is om een Ca^{2+} -stijging uit te lokken (27).

De reden waarom bij hogere dosissen de respons lager is, kan verklaard worden door desensitisatie van de receptoren (63). Internalisatie van de receptoren, mogelijk via een endocytotisch proces, beschermt de cellen van overmatige hormoonstimulatie. In vivo wordt

deze bescherming aangevuld door de aanwezigheid van kininases, die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van BK (28).

Angiotensine II

Stimulatie van de primaire culturen met AngII (0,1 μM en 1 μM) resulteerde in een langzame Ca^{2+} -stijging, vervolgens overgaand in een plateau. Eerdere bevindingen toonden echter een snelle, transiënte Ca^{2+} -stijging al dan niet gevolgd door een onderhouden gestegen Ca^{2+} -niveau (64, 65, 66).

Het feit dat de snelle piek niet werd waargenomen, is mogelijk te wijten aan de tijdsresolutie van het meetsysteem. Zoals in het geval van BK kan de manuele toediening van AngII de oorzaak zijn van het 'diffuse' effect. Een andere verklaring voor de slechts lichte Ca^{2+} -stijging is misschien de lage dichtheid van AngII-receptoren in de primaire culturen.

Om de dosisafhankelijkheid van de Ca^{2+} -respons na te gaan, werd AngII in verschillende concentraties (0,1 μM of 1 μM) toegediend. Dit resulteerde in vergelijkbare stijgingen in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. De reden dat geen significant verschil werd waargenomen tussen beide concentraties kan te wijten zijn aan het feit dat concentraties in het micromolaire bereik reeds de maximale Ca^{2+} -respons veroorzaken.

20.3.2 Effect van hormoonstimulatie in primaire culturen versus vers geïsoleerde tubuli

De Ca^{2+} -responsen bij hormoonstimulatie werden vergeleken tussen primaire culturen en vers geïsoleerde proximale tubuli. De responsen waren niet significant verschillend tussen beide in vitro systemen. Wel was er sprake van een trend dat de primaire culturen een grotere Ca^{2+} -stijging veroorzaken in respons op het hormoon.

Aangezien vers geïsoleerde tubuli dichter aansluiten bij de in vivo situatie werd een hogere respons op de hormonen verwacht. Een mogelijke verklaring voor de lager dan verwachte respons is de mechanische stress die gepaard gaat met de isolatieprocedure van de proximale tubuli en mogelijk leidt tot endocytose van de hormoonreceptoren (67). Ook de enzymatische vertering met collagenase kan resulteren in de verwijdering van hormoonreceptoren van het plasmamembraan.

In het geval van primaire culturen kan tijdens de incubatieperiode resynthese van hormoonreceptoren plaatsvinden, wat de lichtjes hogere Ca^{2+} -respons in de primaire culturen verklaart.

20.4 Effect van Cd op de intracellulaire Ca^{2+} -homeostase

Het effect van Cd op de intracellulaire Ca^{2+} -homeostase werd nagegaan door de primaire culturen gedurende 24 uur bloot te stellen aan $CdCl_2$ (100 nM of 1 μ M). Bij beide concentraties werd een gelijkaardige, dalende trend in $[Ca^{2+}]_i$ waargenomen. Jiang et al. (1995) daarentegen leverden bewijs voor een gestegen $[Ca^{2+}]_i$ in primaire culturen van proximale tubuluscellen na behandeling met Cd (49).

Een gedaalde $[Ca^{2+}]_i$ na Cd-blootstelling kan verklaard worden aan de hand van de volgende hypothetische mechanismen. Globaal gezien wordt $[Ca^{2+}]_i$ gereguleerd door het evenwicht tussen influx- en effluxmechanismen over het plasmamembraan. Mogelijk verstoort Cd dit evenwicht ofwel door de efflux van Ca^{2+} te doen stijgen ofwel door een inhiberende invloed op de Ca^{2+} -influx. Deze influx zou gebeuren via SOC's die gekoppeld zijn aan de Ca^{2+} -inhoud van het ER. In fysiologische omstandigheden is er een constant lek van Ca^{2+} uit deze intracellulaire opslagplaats. Eens in het cytosol wordt Ca^{2+} naar buiten gedreven via transporters aanwezig in het plasmamembraan en wordt het opgenomen in de mitochondriën en het ER. De affiniteit van Ca^{2+} voor de SERCA-pomp van het ER is echter veel lager dan de affiniteit voor de mitochondriale Ca^{2+} -uniporter, met gevolg dat het ER in mindere mate wordt voorzien van Ca^{2+} . Dit resulteert in de opening van SOC's om terug het oorspronkelijke Ca^{2+} -niveau in het ER te bereiken.

Na 24 uur blootstelling aan Cd is het zware metaal binnengedrongen in de proximale tubuluscel (46) en treedt er competitieve inhibitie van de Ca^{2+} -opname via de mitochondriale Ca^{2+} -uniporter op (68). Dit wordt gecompenseerd door een hogere Ca^{2+} -opname in het ER, met als gevolg dat het signaal naar de SOC's om het ER te vullen, afgezwakt wordt. Een verminderde instroom van Ca^{2+} is bijgevolg mogelijk, resulterend in een lagere $[Ca^{2+}]_i$.

21 Algemene conclusie

De techniek om proximale tubuluscellen van de muis in cultuur te brengen werd correct uitgevoerd. Met de lichtmicroscop en transmissie elektronenmicroscop werd nagegaan of de cellen differentiëren. Morfologische kenmerken, typisch voor proximale tubuluscellen, konden waargenomen worden. Functioneel werden de primaire culturen gekarakteriseerd door de aanwezigheid van γ -GT en receptoren voor BK en AngII. Naast het bestuderen van de functies van de proximale tubuluscellen kan het cultuursysteem ook aangewend worden in de studie naar de toxische effecten van bijvoorbeeld Cd. Preliminair experimenten toonden een effect van Cd aan op de intracellulaire Ca^{2+} -homeostase.

De vers geïsoleerde tubuli daarentegen vormden een complexer in vitro systeem dan de primaire culturen. Toch kon de aanwezigheid van receptoren voor BK en AngII aangetoond worden.

REFERENTIES

1. Rodilla V, Miles AT, Jenner W, Hawksworth GM. Exposure of cultured human proximal tubular cells to cadmium, mercury, zinc and bismuth: toxicity and metallothionein induction. *Chem Biol Interact.* 1998 Aug 14;115(1):71-83.
2. Boron W.F., Boulpaep E.L. *Medical Physiology.* Philadelphia: Saunders, 2003.p.737-747.
3. Suzuki M, Kawaguchi Y, Kurihara S, Miyahara T. Heterogeneous response of cytoplasmic free Ca²⁺ in proximal convoluted and straight tubule cells in primary culture. *Am J Physiol.* 1989 Nov;257(5 Pt 2):F724-31.
4. Goligorsky MS, Loftus DJ, Hruska KA. Cytoplasmic calcium in individual proximal tubular cells in culture. *Am J Physiol.* 1986 Nov;251(5 Pt 2):F938-44.
5. Bonventre JV, Cheung JY. Cytosolic free calcium concentration in cultured renal epithelial cells. *Am J Physiol.* 1986 Feb;250(2 Pt 2):F329-38.
6. Murphy E, Mandel LJ. Cytosolic free calcium levels in rabbit proximal kidney tubules. *Am J Physiol.* 1982 Jan;242(1):C124-8.
7. Zhang C, Mayeux PR. Angiotensin II signaling activities the NO-cGMP pathway in rat proximal tubules. *Life Sci.* 1998;63(4):PL75-80.
8. Exton JH. Calcium signalling in cells-molecular mechanisms. *Kidney Int Suppl.* 1987 Dec;23:S68-81.
9. Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 1998 Sep 15;17(18):5298-308.
10. Zhang MI, O'Neil RG. An L-type calcium channel in renal epithelial cells. *J Membr Biol.* 1996 Dec;154(3):259-66.
11. White KE, Gesek FA, Nesbitt T, Drezner MK, Friedman PA. Molecular dissection of Ca²⁺ efflux in immortalized proximal tubule cells. *J Gen Physiol.* 1997 Feb;109(2):217-28.
12. Taylor A, Windhager EE. Possible role of cytosolic calcium and Na-Ca exchange in regulation of transepithelial sodium transport. *Am J Physiol.* 1979 Jun;236(6):F505-12.
13. Dominguez JH, Juhaszova M, Kleiboeker SB, Hale CC, Feister HA. Na(+)-Ca²⁺ exchanger of rat proximal tubule: gene expression and subcellular localization. *Am J Physiol.* 1992 Nov;263(5 Pt 2):F945-50.
14. Ramachandran C, Brunette MG. The renal Na⁺/Ca²⁺ exchange system is located exclusively in the distal tubule. *Biochem J.* 1989 Jan 1;257(1):259-64.
15. Tortelote GG, Valverde RH, Lemos T, Guilherme A, Einicker-Lamas M, Vieyra A. The plasma membrane Ca²⁺ pump from proximal kidney tubules is exclusively localized and active in caveolae. *FEBS Lett.* 2004 Oct 8;576(1-2):31-5.
16. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):259-68.
17. Wu MJ, Lai LW, Lien YH. Cytoprotective effects of calbindin-D(28k) against antimycin-A induced hypoxic injury in proximal tubular cells. *Life Sci.* 2002 Jun 21;71(5):559-69.
18. Meldolesi J, Pozzan T. The heterogeneity of ER Ca²⁺ stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function. *J Cell Biol.* 1998 Sep 21;142(6):1395-8.
19. Rizzuto R, Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev.* 2006 Jan;86(1):369-408.
20. Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Apr;87(7):2466-70.
21. Berridge MJ, Dawson RM, Downes CP, Heslop JP, Irvine RF. Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem J.* 1983 May 15;212(2):473-82.
22. Mandel LJ, Murphy E. Regulation of cytosolic free calcium in rabbit proximal renal tubules. *J Biol Chem.* 1984 Sep 25;259(18):11188-96.
23. Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol.* 1998 May 1;348(1):1-10.
24. Tomita K, Pisano JJ. Binding of [3H]bradykinin in isolated nephron segments of the rabbit. *Am J Physiol.* 1984 May;246(5 Pt 2):F732-7.
25. Boels K, Schaller HC. Identification and characterisation of GPR100 as a novel human G-protein-coupled bradykinin receptor. *Br J Pharmacol.* 2003 Nov;140(5):932-8.
26. Tiwari MM, Prather PL, Mayeux PR. Mechanism of bradykinin-induced Ca²⁺ mobilization in murine proximal tubule epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 May;313(2):798-805.

27. Aboolian A, Nord EP. Bradykinin increases cytosolic free [Ca²⁺] in proximal tubule cells. *Am J Physiol*. 1988; 255:F486-F493.
28. Stephenson SL, Kenny AJ. Metabolism of neuropeptides. Hydrolysis of the angiotensins, bradykinin, substance P and oxytocin by pig kidney microvillar membranes. *Biochem J*. 1987 Jan 1;241(1):237-47.
29. Casarini DE, Boim MA, Stella RC, Schor N. Endopeptidases (kininases) are able to hydrolyze kinins in tubular fluid along the rat nephron. *Am J Physiol*. 1999 Jul;277(1 Pt 2):F66-74.
30. Douglas JG. Angiotensin receptor subtypes of the kidney cortex. *Am J Physiol*. 1987 Jul;253(1 Pt 2):F1-7.
31. Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S, Yamakawa T. Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999 Jul;26(7):544-9.
32. Zhuo JL, Li XC, Garvin JL, Navar LG, Carretero OA. Intracellular Angiotensin II Induces Cytosolic Ca²⁺ Mobilization by Stimulating Intracellular AT1 Receptors in Proximal Tubule Cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Dec 27.
33. Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S, Yamakawa T. Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999 Jul;26(7):544-9.
34. Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW Jr. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol*. 1999 Sep;277(3 Pt 2):F437-46.
35. Mujais SK, Kauffman S, Katz AI. Angiotensin II binding sites in individual segments of the rat nephron. *J Clin Invest*. 1986 Jan;77(1):315-8.
36. Yanagawa N. Angiotensin II and proximal tubule sodium transport. *Ren Physiol Biochem*. 1991 Jul-Oct;14(4-5):208-15.
37. Madhun ZT, Goldthwait DA, McKay D, Hopfer U, Douglas JG. An epoxygenase metabolite of arachidonic acid mediates angiotensin II-induced rises in cytosolic calcium in rabbit proximal tubule epithelial cells. *J Clin Invest*. 1991 Aug;88(2):456-61.
38. Wirthensohn G, Guder WG. Stimulation of phospholipid turnover by angiotensin II and phenylephrine in proximal convoluted tubules microdissected from mouse nephron. *Pflügers Arch*. 1985 May;404(1):94-6.
39. Welsh C, DUBYAK G, Douglas JG. Relationship between phospholipase C activation and prostaglandin E2 and cyclic adenosine monophosphate production in rabbit tubular epithelial cells. Effects of angiotensin, bradykinin, and arginine vasopressin. *J Clin Invest*. 1988 Mar;81(3):710-9.
40. Poggioli J, Lazar G, Houillier P, Gardin JP, Achard JM, Paillard M. Effects of angiotensin II and nonpeptide receptor antagonists on transduction pathways in rat proximal tubule. *Am J Physiol*. 1992 Oct;263(4 Pt 1):C750-8.
41. Romero MF, Hopfer U, Madhun ZT, Zhou W, Douglas JG. Angiotensin II actions in the rabbit proximal tubule. Angiotensin II mediated signaling mechanisms and electrolyte transport in the rabbit proximal tubule. *Ren Physiol Biochem*. 1991 Jul-Oct;14(4-5):199-207.
42. Charbonneau A, Leclerc M, Brunette MG. Effect of angiotensin II on calcium reabsorption by the luminal membranes of the nephron. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Jun;280(6):E928-36.
43. Cuypers Y, McConaghey P, Steels P. The direct renal tubular effect of angiotensin II in chicken. *Ren Physiol Biochem*. 1993 Nov-Dec;16(6):325-32.
44. Zalups RK, Ahmad S. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003 Feb 1;186(3):163-88.
45. Thevenod F. Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol*. 2003;93(4):p87-93.
46. Barbier O, Dauby A, Jacquillet G, Tauc M, Poujeol P, Coughnon M. Zinc and cadmium interactions in a renal cell line derived from rabbit proximal tubule. *Nephron Physiol*. 2005;99(3):p74-84.
47. Prozialeck WC. Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000 May 1;164(3):231-49.
48. Endo T. Transport of cadmium across the apical membrane of epithelial cell lines. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2002 Mar;131(3):223-9.
49. Jiang T, Tan B, Guan W. Effects of cadmium on calcium homeostasis of isolated epithelial cells of proximal renal tubules. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 1995 May;29(3):153-5.
50. Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2004 Jun 1;36(11):1434-43.
51. Thevenod F, Friedmann JM. Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na⁺/K⁺-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *FASEB J*. 1999 Oct;13(13):1751-61.
52. Benters J, Flogel U, Schafer T, Leibfritz D, Hechtenberg S, Beyersmann D. Study of the interactions of cadmium and zinc ions with cellular calcium homeostasis using 19F-NMR spectroscopy. *Biochem J*. 1997 Mar 15;322 (Pt 3):793-9.

-
53. Souza V, Bucio L, Jay D, Chavez E, Gutierrez-Ruiz MC. Effect of cadmium on calcium transport in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology*. 1996 Aug 16;112(2):97-104.
54. Walsh-Reitz MM, Toback FG. Phenol red inhibits growth of renal epithelial cells. *Am J Physiol*. 1992 Apr;262(4 Pt 2):F687-91.
55. Boogaard PJ, Nagelkerke JF, Mulder GJ. Renal proximal tubular cells in suspension or in primary culture as in vitro models to study nephrotoxicity. *Chem Biol Interact*. 1990;76(3):251-91.
56. Szasz, G. A kinetic photometric method for serum γ -glutamyl-transpeptidase. *Clin Chem*. 1969; 15:124-136.
57. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985 Mar 25;260(6):3440-50.
58. Van den Bergh V, Boens N, De Schryver FC, Ameloot M, Steels P, Gally J, Vincent M, Kowalczyk A. Photophysics of the fluorescent Ca²⁺ indicator Fura-2. *Biophys J*. 1995 Mar;68(3):1110-9.
59. Chung SD, Alavi N, Livingston D, Hiller S, Taub M. Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a hormonally defined medium. *J Cell Biol*. 1982 Oct;95(1):118-26.
60. Bell CL, Tenenhouse HS, Scriver CR. Initiation and characterization of primary mouse kidney epithelial cultures. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1988 Jul;24(7):683-95.
61. Sutterlin GG, Laverty G. Characterization of a primary cell culture model of the avian renal proximal tubule. *Am J Physiol*. 1998 Jul;275(1 Pt 2):R220-6.
62. Toutain H, Vauclin-Jacques N, Fillastre JP, Morin JP. Biochemical, functional, and morphological characterization of a primary culture of rabbit proximal tubule cells. *Exp Cell Res*. 1991 May;194(1):9-18.
63. Lohse MJ. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Nov 7;1179(2):171-88.
64. Bouby N, Hus-Citharel A, Marchetti J, Bankir L, Corvol P, Llorens-Cortes C. Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron. *J Am Soc Nephrol*. 1997 Nov;8(11):1658-67.
65. Poggioli J, Lazar G, Houillier P, Gardin JP, Achard JM, Paillard M. Effects of angiotensin II and nonpeptide receptor antagonists on transduction pathways in rat proximal tubule. *Am J Physiol*. 1992 Oct;263(4 Pt 1):C750-8.
66. Jung KY, Endou H. Biphasic increasing effect of angiotensin-II on intracellular free calcium in isolated rat early proximal tubule. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Dec 29;165(3):1221-8.
67. Wagner CA, Lukewille U, Valles P, Breton S, Brown D, Giebisch GH, Geibel JP. A rapid enzymatic method for the isolation of defined kidney tubule fragments from mouse. *Pflugers Arch*. 2003 Aug;446(5):623-32.
68. Chavez E, Briones R, Michel B, Bravo C, Jay D. Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium transport: studies with cadmium. *Arch Biochem Biophys*. 1985 Nov 1;242(2):493-7.

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen en uw akkoord te verlenen.

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Primaire cultuur van proximale tubuluscellen van de muis: cytosolaire calcium in functie van hormoonstimulatie

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2006**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt houdt in dat ik/wij als auteur de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij kan reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

U bevestigt dat de eindverhandeling uw origineel werk is, en dat u het recht heeft om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. U verklaart tevens dat de eindverhandeling, naar uw weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

U verklaart tevens dat u voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen hebt verkregen zodat u deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal u als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze licentie

Ik ga akkoord,

Mieke TIMMERS

Datum: