

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
MEDIZINISCHE ZELLBIOLOGIE

IM INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. RICHARD WARTH

NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT III
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Das entwicklungsabhängige Expressionsmuster von Kaliumkanälen in der Niere

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von Christine Meier

2011

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
MEDIZINISCHE ZELLBIOLOGIE

IM INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. RICHARD WARTH

NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT III
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Das entwicklungsabhängige Expressionsmuster von Kaliumkanälen in der Niere

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von Christine Meier

2011

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Richard Warth
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Banas
Tag der mündlichen Prüfung:	02.08.2011

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	3
1.1 Funktionen der Niere.....	3
1.2 Aufbau der Niere	4
1.3 Kaliumtransport entlang des Nephrons.....	6
1.4 K ⁺ -Kanal-Familien	8
1.4.1 Nomenklatur.....	8
1.5 Weitere für die Arbeit relevante Transportproteine der Niere.....	13
1.5.1 αENaC.....	13
1.5.2. SGLT1 und SGLT2.....	13
2. ZIELSETZUNG	14
3. VERSUCHSTIERE, MATERIALIEN UND METHODEN.....	15
3.1 Versuchstiere.....	15
3.1.1 Gewebe für Real-Time PCR.....	15
3.1.2 Immunfluoreszenzfärbungen.....	16
3.2 Präparation der RNA.....	16
3.2.1 Materialien	16
3.3 cDNA-Synthese	18
3.3.1 Chemikalien	18
3.4 Primerdesign und Primertestung	21
3.4.1 Primerdesign	21
3.4.2 Primertest	23
3.5 Real-Time PCR	25
3.5.1 Chemikalien und Gerät.....	25
3.5.2 Vorgehensweise.....	26
3.6 Schnitte und Immunfluoreszenzfärbungen.....	27
3.6.1 Schnitte	27
3.6.2 Chemikalien für Immunfluoreszenzfärbung	27
3.6.3 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen.....	27
4. ERGEBNISSE.....	28
4.1 Ergebnisse der Real-Time Analyse.....	28
4.1.1 Kaliumkanäle und Transportproteine, deren Expression im Verlauf der Entwicklung zunimmt.....	29
4.1.2 Kaliumkanäle, deren Expression im Verlauf der Entwicklung stabil bleibt.....	43

4.1.3 Kaliumkanäle, deren Expression im Verlauf der Entwicklung abnimmt	44
5. DISKUSSION	51
6. ZUSAMMENFASSUNG	56
7. LITERATURVERZEICHNIS	57

1. EINLEITUNG

1.1 Funktionen der Niere

Die Niere ist ein in der Regel paarig angelegtes, retroperitoneal beidseits der Wirbelsäule gelegenes Organ, welches sowohl inkretorische als auch exkretorische Funktionen erfüllt [56]. Als harnbereitendes Organ ist die Niere lebenswichtig, indem sie unter anderem folgende wichtige Aufgaben wahrnimmt [31]:

1. Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushalts. Die Ausscheidung von Wasser und Salzen wird den jeweiligen Erfordernissen des Körpers angepasst [31] und das Volumen sowie die Osmolarität des Extrazellulärspaces konstant gehalten [73]. Pro Tag werden 180-200 Liter Primärharn filtriert, wovon je nach Flüssigkeitsaufnahme 0,7 bis mehrere Liter ausgeschieden werden [31].
2. Ausscheidung von endogen entstandenen Stoffwechselendprodukten und körperfremden Substanzen [31;73]. Bei Ersteren handelt es sich vor allem um Endprodukte des Protein-, Stickstoff- und Purinstoffwechsels wie z.B. Harnstoff, Harnsäure oder Phosphat. Zu den körperfremden Substanzen, die von der Niere ausgeschieden werden, gehören vor allem eine Reihe von Medikamenten und Giftstoffe.
3. Vermeidung des Verlustes von lebensnotwendigen Substraten. Durch die Bildung der großen Menge Primärharns läuft der Körper Gefahr, dass darin befindliche Nährstoffe und Substrate mit dem Urin verloren gehen. [31]. Um dies zu verhindern, werden Plasmaproteine und Blutzellen durch das glomeruläre Filter zurückgehalten und gelangen erst gar nicht in den Primärurin. Kleinere Substrate (Molekulargewicht unter 15 kD) wie Aminosäuren und Glucose werden im Tubulussystem rückresorbiert und dadurch ihr Verlust mit dem Urin vermieden [73].
4. Regulation des Säure-Basen-Haushaltes. Der Säure-Basen-Haushalt wird maßgeblich von der Nierenfunktion beeinflusst [31], indem die Ausscheidung von Protonen, Ammoniumionen und Säureanionen an den jeweiligen Körperstatus angepasst wird. Bei Bedarf kann die Niere aber auch Bikarbonat ausscheiden und dadurch den Blut-pH absenken.

5. Die Niere als endokrines Organ. Die Niere ist bekannt als Zielorgan verschiedener Hormone, z.B. von Angiotensin II, Aldosteron und Adiuretin, welche den Salz-Wasserhaushalt und damit den arteriellen Blutdruck beeinflussen, oder von Parathormon und Calcitonin, welche den Ca^{2+} und Phosphatstoffwechsel regulieren [73]. Gleichzeitig werden aber auch verschiedene Hormone in der Niere selbst gebildet und ins Blut abgegeben, z.B. Renin, Erythropoietin und Vitamin D3 [31].

1.2 Aufbau der Niere

Die menschliche Niere hat eine Größe von etwa 10x5x4cm und wiegt 120-300g [73]. Bereits makroskopisch fällt die Aufteilung der Niere in Cortex (Rinde) und Medulla (Mark) (s. Abb. 1) auf [73]. Die Spitzen der Markpyramiden münden in die Nierenkelche und werden als Papille bezeichnet [73]. Die menschliche Niere (Abb. Nr. 1) weist 7-9 Markpyramiden auf, wohingegen kleinere Säugetiere wie beispielsweise die Maus, nur eine besitzen [73].

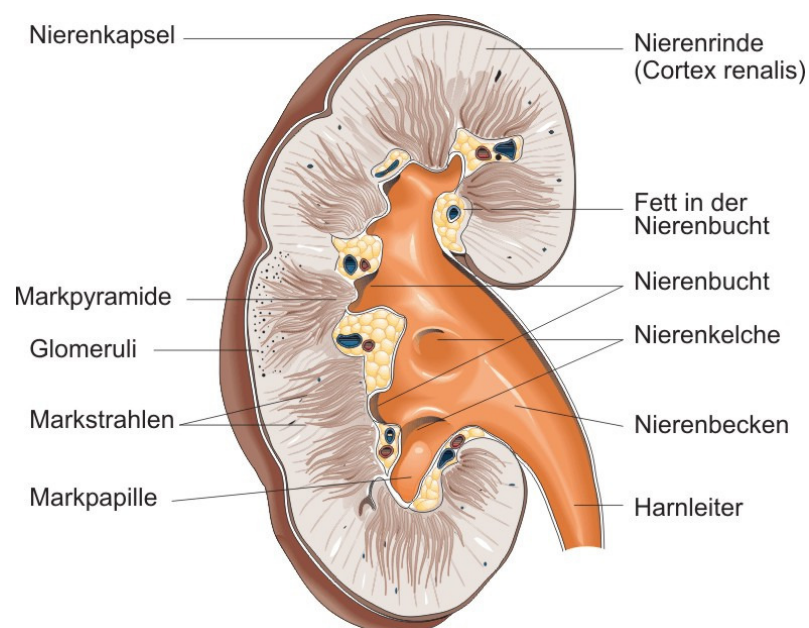


Abb. 1: Niere des Menschen im Längsschnitt, schematische Darstellung (modifiziert nach: U.M. Spornitz • Lehrbuch und Atlas für Pflege- und Gesundheitsfachberufe, 3. Auflage)

Die Niere verfügt über eine komplexe Blutversorgung und erhält 20-25% des Herzminutenvolumens, entsprechend 1,2 l/min [73].

Am Nierenhilum tritt die Nierenarterie in das Organ ein und teilt sich in 4-5 Aa. interlobares, welche sich an der Basis der Pyramiden in die Aa. arcuatae aufzweigen, von welchen wiederum die Aa. interlobulares abgehen [1;73]. Die Aa. afferentes entstehen aus den Interlobulararterien, treten in das Glomerulum ein und bilden dort die glomerulären Kapillaren [1].

Am Ende der Glomerulumkapillaren entstehen aus ihnen wiederum die efferenten Arteriolen, welche im Bereich des Rinden-Mark-Übergangs die Vasa recta bilden, die das Mark arteriell versorgen [73]. Aus diesen entstehen venöse Vasa recta, die in Vv. arcuatae übergehen. Letztere verlaufen parallel zu den Aa. arcuatae, nehmen vom Cortex kommende Vv. interlobulares auf und münden schließlich in die Vv. interlobares, die am Hilum als Nierenvene das Organ verlässt [73].

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, welches sich aus dem Nierenkörperchen (Glomerulum) und dem davon abgehenden Tubulussystem zusammensetzt. Im Glomerulum erfolgt über die Ultrafiltration die Bildung des Primärharns; die Filtrationsmenge pro Zeit wird dabei als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bezeichnet [73]. Die Filtration ist hierbei abhängig von Größe, Form und Ladung der Moleküle sowie der Filtrationsfläche, der Größe der Poren und der jeweiligen Fixladungsdichte [31].

Das Tubulussystem (Abb. Nr. 2) besteht aus proximalen Tubuli mit Pars convoluta und Pars recta, intermediären Tubuli und distalen Tubuli mit Pars recta und Pars convoluta sowie den Verbindungsstücken und dem Sammelrohr. Partes recta der proximalen und distalen Tubuli bilden zusammen mit den intermediären Tubuli die Henle-Schleifen, welche bei den juxtamedullär (marknah) gelegenen Nephronen bis tief ins Mark reichen können [73].

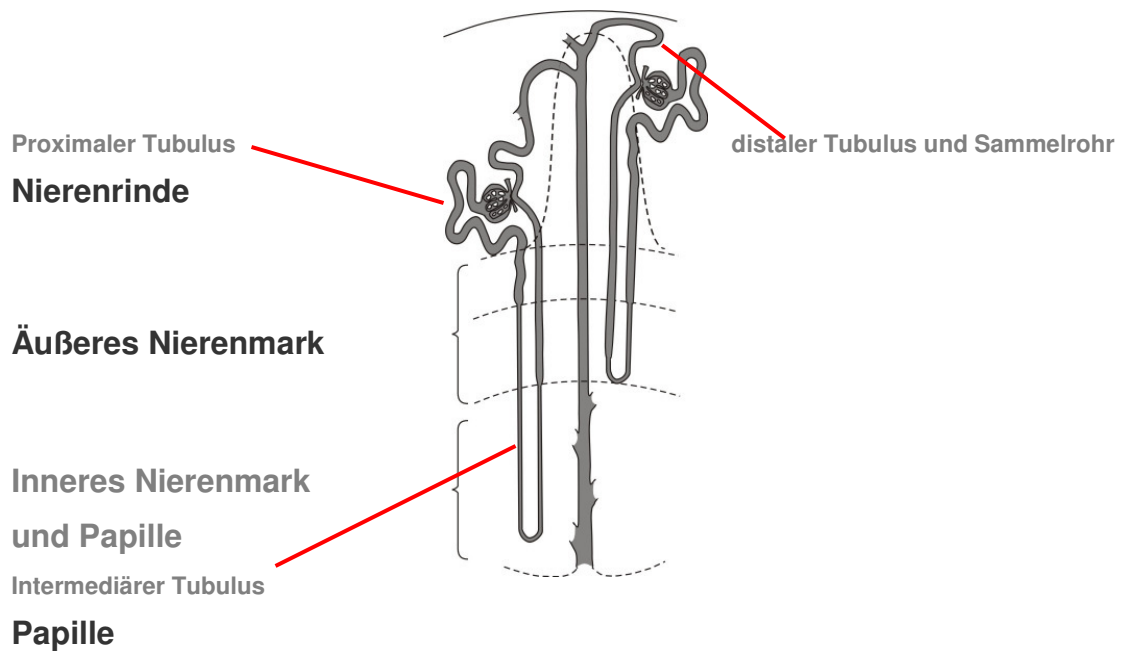


Abb. 2: Das Nephron, schematische Darstellung

In den Tubuli erfolgt die Modifikation des Primärharns, indem mittels Sekretion und Resorption die Konzentration der gelösten Stoffe an die jeweiligen Erfordernisse angepasst wird. Beispielsweise erfolgt mittels Resorption im proximalen Tubulus die Rückgewinnung von 60-70% des filtrierte Natriums und Wassers [31;73] sowie die Rückresorption von Glukose und Aminosäuren [73]. Über kurze Verbindungstubuli (Tubuli reunitens) erfolgt die Einmündung der distalen Tubuli in die Sammelrohre. Jeweils ca. 10 solcher Tubuli reunitens münden in ein Sammelrohr. Die Sammelrohre wiederum verbinden sich auf ihrem Weg ins innere Mark zu größerkalibrigen Sammelrohren um im Bereich der Papille einen Durchmesser von 100-200µm zu erreichen [73].

1.3 Kaliumtransport entlang des Nephrons

Weil über die Niere ca. 90% der über den Gastrointestinaltrakt aufgenommenen Kaliumionen ausgeschieden werden, stellt die Niere eine zentrale Komponente für die Kalium-Homöostase dar [23].

Im Glomerulum der Niere wird Kalium frei filtrierte; das heißt, im Primärfiltrat entspricht die Konzentration der Plasmakaliumkonzentration. Im proximalen

Tubulus wird ein Großteil des filtrierten Kaliums wieder rückresorbiert [20;29;31]. Die Resorption erfolgt parazellulär mittels Diffusion und solvent drag [72]. Der Kalium-Transport ist hierbei abhängig vom Natrium-Transport [23], der die osmotische Triebkraft für die Wasserverschiebung bildet. Solvent drag bezeichnet hier das Mitreißen von Kalium als konvektives Teilchen mit dem parazellulären Wasserstrom. Dies wird begünstigt durch den niedrigen Reflexionskoeffizienten für Kalium entlang des proximalen Tubulus [68]. Im späten Teil des proximalen Tubulus unterstützt zusätzlich ein Lumen-positives transepitheliales Potential die parazelluläre Kaliumresorption [23].

Die Kalium-Kanäle in der apikalen Membran des proximalen Tubulus dienen der Repolarisation der apikalen Membran und vermutlich der Zellvolumenregulation, sie führen jedoch nicht zu einer quantitativ relevanten Kaliumsekretion [22;52].

Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife wird Kalium wie im proximalen Tubulus durch eine Lumen-positive transepitheliale Spannung parazellulär, sowie zusätzlich über einen apikal lokalisierten $\text{Na}^+2\text{Cl}^-\text{K}^+$ -Kotransporter resorbiert [24;28]. Hier finden sich aber auch apikal gelegene Kalium-Kanäle (ROMK=KCNJ1), durch die Kalium in die Tubulusflüssigkeit abgegeben wird. Dadurch entsteht eine Hyperpolarisation der Zellmembran, wodurch der Ausstrom von Chlorid an der basolateralen Membran begünstigt wird [29]. Die apikale Kaliumleitfähigkeit und die basolaterale Chloridleitfähigkeit polarisieren die entsprechenden Membranen unterschiedlich und erzeugen dadurch das oben genannte Lumen-positive transepitheliale Potential, welches die Antriebskraft für einen kationenselektiven parazellulären Strom von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium darstellt [23;29]. Außerdem wird durch die apikalen Kaliumkanäle sichergestellt, dass immer ausreichend Kalium im Lumen vorhanden ist, damit der $\text{Na}^+2\text{Cl}^-\text{K}^+$ -Kotransporter dauerhaft aktiv sein kann [29]. Bei einer verminderten Kalium-Sekretion über die ROMK-Kanäle sinkt auch die Aktivität des Kotransporters. So ist deshalb beim Bartter-Syndrom Typ II wegen eines genetischen Defekts die Aktivität der Kalium-Kanäle im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife vermindert, was ebenfalls zu einem verminderten $\text{Na}^+2\text{Cl}^-\text{K}^+$ -Kotransport und zu schwerem Salzverlust führt [64]. Darüber hinaus können Schleifendiuretika den $\text{Na}^+2\text{Cl}^-\text{K}^+$ -Kotransporter pharmakologisch hemmen [23].

In distalen Nephronabschnitten (distales Convolut, Verbindungsstück und Sammelrohr) erfolgt bedarfsadaptiert die Sekretion bzw. Rückresorption von Kalium [20;29]. Besonders ausgeprägt ist dabei die Fähigkeit zur Kaliumsekretion im Bereich der corticalen Sammelrohre [29]. Die Hauptaufgabe der distalen Tubuli liegt hingegen in der transzellulären Resorption von Natrium, Magnesium- und Calcium [5;14;15].

In den Hauptzellen und Nebenzellen der kortikalen Sammelrohre (CCD) spielt sich die Sekretion von Kalium ab [20;21]. Durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in der basolateralen Membran gelangt Kalium primär aktiv in die Zelle und diffundiert dann passiv über apikal gelegene Kanäle durch die luminale Membran. Die Kaliumsekretion wird dabei durch eine Hyperkaliämie, durch eine gleichzeitige Natriumresorption (Hauptzellen) und durch erhöhten Harnfluss (Nebenzellen) begünstigt [20]. Auch in den Zellen der äußeren medullären Sammelrohre (OMCD) spielen die apikalen Kalium-Kanäle eine wichtige Rolle. Allerdings sind sie hier an die Funktion einer $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ gebunden. Bei hoher Kalium-Konzentration sind die Kanäle entsprechend aktiv, während sie in Mangelsituationen herunterreguliert werden. Dies wiederum beeinflusst die Aktivität der $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ [29].

Auch basolateral existieren im distalen Nephron Kalium-Kanäle. Diese regulieren den Leistungsgrad der Sekretion, indem sie die Menge des rezirkulierenden Kaliums kontrollieren [39;53;60]. Darüber hinaus regulieren sie die basolaterale Potenzialdifferenz und beeinflussen somit den apikalen Natriumeinstrom [47;48].

1.4 K^+ -Kanal-Familien

1.4.1 Nomenklatur

Die Familie der Kalium-Kanäle ist unter den Ionenkanälen eine der umfangreichsten im Reich der Säugetiere. Im menschlichen Genom sind 78 verschiedene Gene für die porenbildenden Untereinheiten von Kalium-Kanälen bekannt.

Darüber hinaus führen Spleiß-Varianten und die Möglichkeit zur Hetero-Oligomerisation zu einer noch größeren Variabilität der Kanäle in den verschiedenen nativen Geweben [36;69].

Einer der ersten Kaliumkanäle, der identifiziert werden konnte, war der Shaker-Kanal im Genom von *Drosophila melanogaster* [58]. Hierbei handelt es sich um einen spannungsgesteuerten (voltage gated) Kaliumkanal, dessen Abwesenheit (wenn er durch eine Mutation inaktiviert war) unter gleichzeitiger Ether-Anästhesie zu heftigem Zittern der Fliegen führte (shaking). Mittels elektrophysiologischer Untersuchungen konnte der Kanal näher untersucht und charakterisiert werden [59]. In der Folge wurden weitere Kanäle im Genom der Fruchtfliege benannt: shab, shal, shaw.

1993 wurde zur besseren Übersichtlichkeit von der International Union of Pharmacology (IUPHAR) die Kv-Nomenklatur für die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle eingeführt. Bei einer genetischen Übereinstimmung von 65% der Aminosäuresequenz wurde der Kanal der jeweiligen Subfamilie zugeteilt [13;33]. Zunächst entstanden die Subfamilien Kv1-Kv6. Mit der Entdeckung neuerer Kanäle setzte man das System entsprechend fort. Andere Kanäle wie beispielsweise Eag (von ether-a-go-go abgeleitet) wurden dieser Nomenklatur nicht beigelegt [33].

Ein etwas später (1997) vom Human Gene Nomenclature Committee der Human Genome Organisation (HUGO) eingeführtes System stellt das "KCN"-Verzeichnis dar, welches die phylogenetischen und strukturellen Beziehungen zum Teil ignoriert, jedoch eine eindeutige Zuordnung der Gene zur Familie der Kaliumkanäle anzeigt [74]. Auf Grund der seitdem neu hinzugekommenen Kanäle wurden beide Systematiken immer wieder ergänzt.

1.4.2 Topologie

Auch bezüglich ihrer Membrantopologie können die Kalium-Kanäle in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Das wichtigste Kriterium hierfür ist die Anzahl der Transmembrandomänen der Untereinheiten, die den Kanal bilden. Dabei finden sich Exemplare mit zwei, vier oder sechs Transmembrandomänen (Abb. Nr. 3). Die meisten dieser porenbildenden Untereinheiten weisen eine gemeinsame Sequenz von fünf Aminosäuren (Threonin-Valin-Glycin-Tyrosin-Glycin) auf, die für das Kaliumselektivitätsfilter notwendig und daher ein Kennzeichen von Kaliumkanälen ist [16]. Diese Sequenz befindet sich im „P-Loop“, einer an der Porenbildung beteiligten Proteinschleife [36].

Auf Grund der Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen und ihrer Funktion können die porenbildenden Untereinheiten in drei große Familien unterteilt werden: 1) Untereinheiten mit sechs oder sieben Transmembrandomänen und einem Poren-Loop (6/7TM-1P); 2) Kanaluntereinheiten mit vier Transmembrandomänen und zwei Poren-Loops (4TM-2P); 3) solche mit zwei Transmembrandomänen und einem Poren-Loop (2TM-1P).

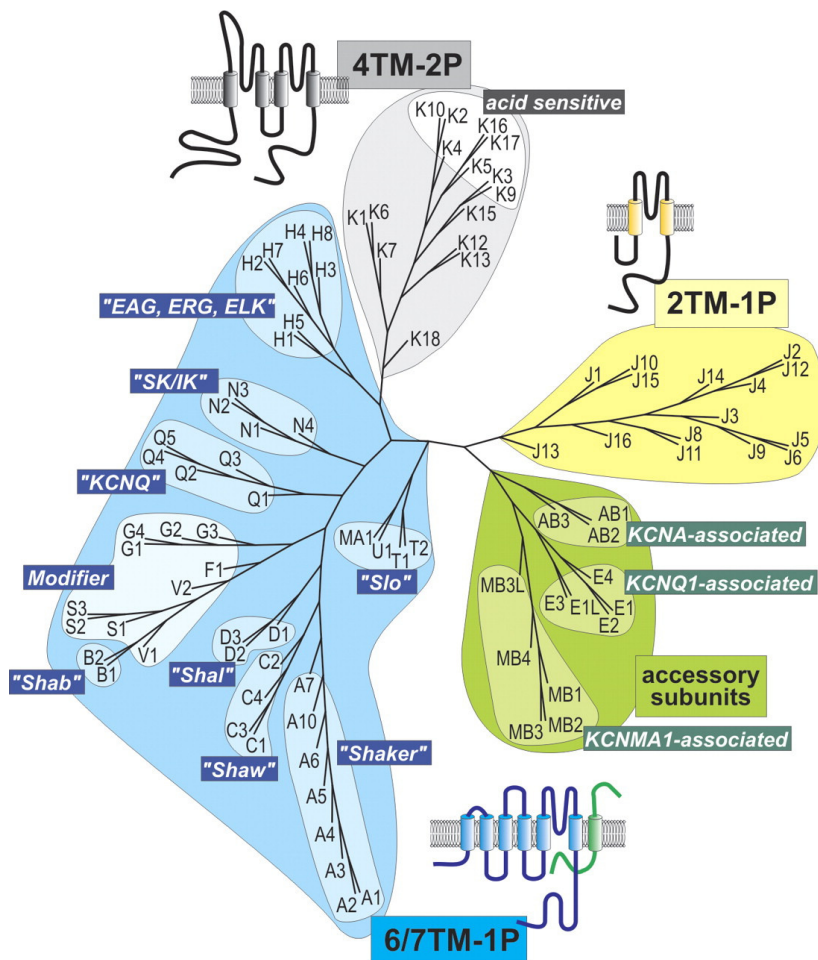


Abb. 3: Graphische Darstellung der Kalium-Kanal-Familien nach der KCN-Nomenklatur; wegen der besseren Übersichtlichkeit wurde „KCN“ jeweils weggelassen.

6/7TM-1P Kanäle

Hierbei handelt es sich um die größte und am besten erforschte Gruppe der Kaliumkanäle. Dazu zählt die große Gruppe der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle [27]. Vier Untereinheiten mit jeweils sechs (im Fall der SLO-Familie 7) Transmembrandomänen bilden mit jeweils einer eigenen porenbildenden Region ein funktionsfähiges Tetramer. Die vier porenbildenden Loops formen dabei maßgeblich die zentral gelegene Pore mit dem Selektivitätsfilter [36;49].

Neben den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen zählen auch zwei Gruppen der calciumabhängigen Kanäle zu den 6/7TM-1P-Kanälen. Die mit niedrigem bis mittlerem (KCNN-Familie) und die mit hohem Einzelkanalleitwert („SLO“-type). In der KCNN-Familie ist die Calciumsensitivität eng an die Kopplung des Kanalproteins an Calmodulin (hier agierend als β -Untereinheit) gebunden, was zu einer sehr starken Ca^{2+} -Abhängigkeit führt [18;62]. Entsprechendes gilt für die „SLO“-type-Kanäle KCNT1-2 und KCNU1, während KCNMA1 (MaxiK-Channel) die cytosolische Ca^{2+} -Aktivität über einen Calciumsensor am Ende des Kanalproteins erkennt (Ca^{2+} -Bowl) [4;71].

4TM-2P Kanäle

Diese Kategorie wurde erstmals bei der Analyse des Genoms von *Caenorhabditis elegans* entdeckt [37]. Wenig später fand man mit „TWIK1“ („Tandem of P domains in a Weak Inward rectifying K-Channel“) den ersten 4TM-2P Kanal auch im Säugetiergenom [44].

In dieser Gruppe bilden die Kanalproteine mit ihren vier Transmembrandomänen und jeweils zwei porenbildenden Abschnitten (zwischen TM1 und -2 bzw. TM3 und -4 [30]) ein Dimer, wobei ein funktionsfähiger Kanal entsteht [45].

Man geht davon aus, dass diese Kanäle zu den wichtigen Kaliumhintergrundströmen (so genannte „Leckströme“) in Nervenzellen beitragen [36]. Einige von ihnen können mittels volatiler Anästhetika aktiviert werden [25;36]. Generell trägt die Gruppe der 4TM-2P Kanäle zur basalen Kaliumleitfähigkeit in vielen Geweben bei [46] und wird über eine Vielzahl von Reizen in komplexer Weise reguliert. Dazu zählen beispielsweise die Aktivierung mittels Proteinkinase C [44], die Beeinflussung durch pH-Wert-Veränderungen [36] sowie die Reaktion auf Hypoxie [10;42].

Den 4TM-2P Kanälen wird eine Reihe wichtiger physiologischer wie pathophysiologischer Funktionen zugeschrieben. Hiervon seien der renale Bikarbonat-Transport [70], die Vermittlung von Apoptose und Karzinogenese [54] sowie das Schmerzempfinden [2] genannt. Aber obwohl zahlreiche Tiermodelle Hinweise darauf geben, dass 4TM-2P Kanäle auch beim Menschen krankheitsrelevant sein könnten, konnte bislang nur für TRESK mit seiner Rolle bei der Migräneentstehung ein Zusammenhang zu Erkrankungen beim Menschen nachgewiesen werden [30;41].

2TM-1P Kanäle

Strukturell bestehen diese Untereinheiten aus jeweils zwei Transmembrandomänen und einer porenbildenden Region. Wie die spannungsgesteuerten Kaliumkanäle bilden auch hier jeweils vier Proteine ein funktionsfähiges Tetramer.

Man bezeichnet diese Gruppe auch als Einwärtsgleichrichter [40], da sie einen Kaliumstrom besser in die Zelle hinein als nach außen leiten. Dennoch spielt bei den meisten Zellen der Auswärtsstrom durch diese Kanäle eine bedeutendere Rolle [58]. Die Familie umfasst die G-Protein gekoppelten Einwärtsgleichrichter, die den inhibitorischen Effekt von Acetylcholin an den kardialen Schrittmachern vermitteln, die Einwärtsgleichrichter im Herz- und Skelettmuskel sowie in Nerven- und Gliazellen, wie auch die ATP-abhängigen Kaliumkanäle, die in Verbindung mit einem Sulfonylharnstoffrezeptor in den Betazellen des Pankreas gefunden werden [36].

Viele der Einwärtsgleichrichter sind physiologisch von großer Bedeutung und Mutationen wirken sich in Form von Erkrankungen aus. Wie oben beschrieben spielt der KCNJ1 (ROMK) in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife eine tragende Rolle für die Kaliumsekretion an der luminalen Membran. Ist dieses Kanalprotein von einer loss-of-function Mutation betroffen, kommt es zum Bartter-Syndrom, einer Erkrankung die mit massiven Salzverlusten einhergeht [64]. Im distalen Tubulus spielt der KCNJ10 (Kir4.1) eine tragende Rolle und Mutationen in diesem Gen führen ebenfalls zu einem Salzverlustsyndrom. Da KCNJ10 auch in anderen Geweben, besonders im Gehirn, vorkommt, ist bei KCNJ10-Mutationen der renale Salzverlust nur ein Symptom unter vielen (EAST oder SeSAME Syndrom) [8;61].

Ein weiteres Beispiel bieten Versuche mit KCNJ8-knock-out-Mäusen. Hier treten Symptome auf, die den Vasospasmen bei Prinzmetal-Angina entsprechen, da KCNJ8 den physiologischen Tonus in den Gefäßen beeinflusst [50].

1.5 Weitere für die Arbeit relevante Transportproteine der Niere

1.5.1 α ENaC

Unter ENaC (Epithelial Sodium Channel) versteht man in der apikalen Membran gelegene Natriumkanäle, die strukturell aus drei Untereinheiten (α , β und γ) bestehen. Man findet sie in verschiedenen Natrium-transportierenden Epithelien: in den Atemwegen, im distalen Kolon, in distalen Nephronabschnitten und in den Ausführungsgängen der Schweißdrüsen [11]. Strukturell bestehen diese Untereinheiten aus zwei Transmembrandomänen, einer großen extrazellulär gelegenen Schleife und intrazellulär gelegenen Enden [65].

ENaC-Kanäle spielen physiologisch eine wichtige Rolle für den Flüssigkeitshaushalt und die Kontrolle des Blutdrucks, da ihre Funktion im distalen Nephron das Ausmaß der Natriumabsorption bestimmt [11].

1.5.2. SGLT1 und SGLT2

Bei SGLT1 und SGLT2 handelt es sich um Natrium-Glucose-Kotransporter in der Bürstensaummembran der proximalen Tubuli. Während sich SGLT1 vorwiegend in den distalen Abschnitten (pars recta im Markbereich) findet, ist SGLT2 eher in den pars convoluta im Cortexbereich angesiedelt [3].

Neben ihrer unterschiedlichen Lokalisation lassen sich die beiden Transporter auch in ihrer Affinität und Selektivität unterscheiden. SGLT1 weist dabei eine höhere Affinität zu Natrium und Glucose auf, bezüglich der Selektivität besteht kein Unterschied zwischen Glucose und Galaktose. SGLT2 dagegen besitzt eine 10-fach höhere Selektivität für Glucose, bei insgesamt niedrigerer Affinität [3;76].

1.5.3 NKCC2

NKCC2 ist der apikal gelegene $\text{Na}^+2\text{Cl}^-\text{K}^+$ -Kotransporter in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife, dem eine tragende Rolle für die Salzresorption in diesem Nephronsegment zugeschrieben wird [6;77]. Die Aktivität des Kotransporters wird über verschiedene Mechanismen beeinflusst. Eine Steigerung

erfolgt über Phosphorylierung, intrazellulären Anstieg von Calcium oder Abfall von Chlorid sowie Zellschrumpfung [7]. Mittels Schleifendiuretika wie Furosemid oder Bumetanid kann NKCC2 gehemmt werden [77]. Mutationen des Transportproteins konnten in Zusammenhang mit dem Bartter-Syndrom Typ I gebracht werden [6].

2. Zielsetzung

Kaliumkanäle sind für die normale Funktion der Niere von großer Bedeutung, da sie das für Transportprozesse wichtige Membranpotential maßgeblich bestimmen und da sie direkt die Sekretion von Kalium im distalen Nephron erlauben. Die Expression innerhalb der Niere ist jedoch für viele der verschiedenen Kaliumkanäle immer noch unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war daher die Analyse der Expression von K⁺-Kanalproteinen in der Niere der Maus. Die Untersuchung der Expression erfolgte in Abhängigkeit vom Alter der Tiere, um eventuell vorhandene entwicklungsabhängige Expressionsmuster aufzudecken. Ich habe darüber hinaus die jeweilige Lokalisation der Kanäle innerhalb des Organs bestimmt, das heißt in Cortex, Medulla und Papille. Als Methode wurde die Realtime-PCR verwendet und die Expression der Kanäle mit der von beta-Actin verglichen. Des Weiteren habe ich die Expression der Kaliumkanäle mit der von segmentspezifischen Transportproteinen der Niere verglichen, nämlich mit α ENaC, SGLT1, SGLT2 und NKCC2. Für einige ausgewählte Kanäle wurden zusätzlich Untersuchungen mittels Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

3. VERSUCHSTIERE, MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Gewebe für Real-Time PCR

Für die RNA-Präparation mit anschließender cDNA-Synthese und Real-Time PCR wurden 17 C57BL6 Wildtypmäuse in balanciertem Geschlechterverhältnis eingesetzt (Tabelle 1). Um Streuungen innerhalb verschiedener Stämme auszuschließen, wurden die Tiere für diesen Versuchsteil aus einer gemeinsamen Parenteralgeneration gezüchtet. Um die Expressionsentwicklung verfolgen zu können, wurden vier Altersgruppen mit jeweils möglichst zur Hälfte Männchen und Weibchen gewählt. Für das Neonatalstadium wurden Mäuse verwendet, die höchstens einen Tag alt waren; für den Zeitraum der Laktation 10 Tage alte Tiere; für das Stadium der frühen Adoleszenz (Zeit unmittelbar nach der Nahrungsumstellung von Muttermilch auf Festnahrung) 20 Tage alte Mäuse. Die vierte Gruppe mit ca. 60 Tage alten Tieren entsprach dem Lebensabschnitt der adulten, geschlechtsreifen Maus.

	1Tag	10Tage	20Tage	60Tage
♂	1	5	9	13
	2	6	10	14
	-	-	11	15
♀	3	7	12	16
	4	8	-	17

Tabelle 1: Liste der Probennummern der für die Versuche gezüchteten Mäuse, geordnet nach Alter und Geschlecht

Den euthanasierten Versuchstieren wurden die Nieren für die spätere Präparation der RNA entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff konserviert, um mögliche Schädigungen durch RNasen zu vermeiden und die Organe bis zu ihrer weiteren Verarbeitung aufzubewahren. Bei den nur einen Tag alten Mäusen wurde die Entnahme unter einem Binokular durchgeführt. Auch die Aufteilung jeweils einer der Nieren der älteren Tiere (20 bzw. 60Tage) in Cortex, Medulla und Papille wurde unter dem Mikroskop getätigt. Bei den 60 Tage alten Mäusen

wurden sie einzeln weiterverarbeitet. Bei den jüngeren Tieren wurden Cortex, Medulla und Papille jeweils von verschiedenen Tieren gepoolt, um mehr Ausgangsgewebe für die RNA-Präparationen zur Verfügung zu haben.

3.1.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Für diese Versuchsreihe wurden weitere acht C57BL6 Wildtypmäuse benötigt (Tabelle 2). Die Altersgruppen entsprechen wieder denen für die Real-Time PCR festgelegten. Auch in diesem Fall wurde darauf geachtet, möglichst jeweils ein Männchen und ein Weibchen zu verwenden.

Zur Gewebeaufbereitung für die Immunfärbungen wurden die Tiere zunächst durch Ausbluten (das Blut wurde durch Perfundieren mit NaCl-Lösung unter Isofluran-Anästhesie entfernt) getötet und dann mit 5% Formaldehyd perfundiert. Bei den 10-60 Tage alten Mäusen wurde die Perfusion über die Aorta und mittels Abfluss über die V. cava durchgeführt, bei den 1 Tag alten erfolgt die Perfusion über das Herz. Nach der Perfusion wurden die Nieren entnommen und in PBS + Succrose eingelegt, bis die Organe damit durchtränkt waren. Anschließend wurden sie in -30 °C kaltem Isomethylbutan eingefroren und danach bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Für die RNA-Präparation wurden die Nieren direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2 Präparation der RNA

3.2.1 Materialien

Die RNA-Präparation wurde mit *RNeasy Mini Kit* von QUIAGEN durchgeführt:

RNeasy mini spin columns

Collection tubes (1,5 und 2ml)

Buffer RLT (muss vor Anwendung mit Ethanol 96-100% versetzt werden)

Buffer RW1

Buffer RPE

RNase-free water

Des Weiteren wurde benötigt:

14,3M β -Mercaptoethanol (β -ME)

Ethanol (96-100% und 70%)

RNase-freie Pipetten

Ultrazentrifuge (Hettich Zentrifugen, Mikro 20)

RNase-Free DNase Set (QUIAGEN)

3.2.2 Vorgehensweise

Die in flüssigem Stickstoff konservierten Nieren wurden unter Vermeidung einer Kontamination mit RNAsen mit dem Mörser zerkleinert. Die folgenden Schritte wurden wenn nicht anders vermerkt auf Eis durchgeführt.

Das erhaltene Gewebepulver wurde direkt in vorbereitete 2ml-Tubes mit jeweils 350 μ l RLT Puffer und 3,5 μ l β -ME gegeben und nach der Lyse für 3 Minuten zentrifugiert. Bei größeren Gewebemengen, wie dies z.B. bei den 60 Tage alten Versuchstieren der Fall war, wurden 600 μ l RLT Puffer und entsprechend 6 μ l β -ME eingesetzt. Durch den Guanidin-Isothiozyanat-haltigen RLT Puffer werden die RNAsen sofort denaturiert, was notwendig ist, um die Extraktion intakter RNA zu gewährleisten.

Anschließend wurden die Überstände in neue Tubes pipettiert und erneut für 1 Minute zentrifugiert, um eine bessere Phasenabgrenzung zu erzielen. Dieser zweite Überstand wurde schließlich mit 350 μ l (bzw. 600 μ l s.o.) Ethanol (70%) versetzt, durchmischt, auf die im Kit enthaltenen Säulen aufgetragen und 1 Minute zentrifugiert. Ethanol dient hierbei dazu, die Bindungsvoraussetzung zu verbessern. Die entstandenen Pellets wurden beide Male verworfen.

Die verwendeten Säulen enthalten eine Membran mit Silica-Gel, an welches die RNA adsorbieren kann. Dadurch können in den nachfolgenden Schritten Kontaminationen effizient ausgewaschen werden.

Vor diesem Waschen mit RW1 und RPE Puffer wurde noch zusätzlich ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurden 350 μ l RW1 Puffer auf die Säulen aufgetragen und 1 Minute zentrifugiert. Danach wurden je 10 μ l DNase-I-Lösung mit je 70 μ l RDD Puffer gemischt und auf jeweils eine Säule pipettiert. Dann

wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss daran mit je 350µl RW1 Puffer gewaschen.

Die RNA-Präparation wurde danach durch Zugabe von 500µl RPE Puffer und anschließendes Zentrifugieren für 1 Minute fortgesetzt. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Dann wurde ohne Pufferzugabe ein weiteres Mal zentrifugiert. Zum Schluss wurde mit je 35µl RNase freiem Wasser pro Säule eluiert, wobei vor dem Zentrifugieren für 4 Minuten inkubiert wurde.

Vom erhaltenen Eluat wurden jeweils 3µl mit 2µl Ladepuffer auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen, um das Vorhandensein von RNA zu überprüfen (Abb. Nr. 4).

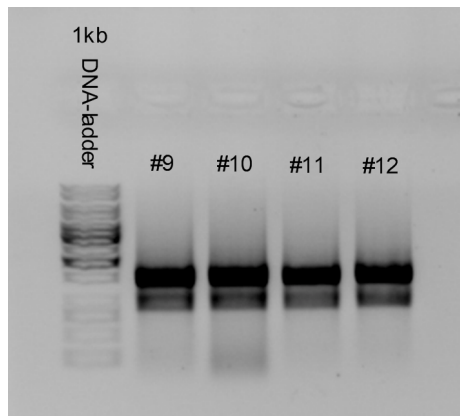


Abb. 4: RNA aus Niere, Maus WT, 20Tage alt

3.3 cDNA-Synthese

3.3.1 Chemikalien

Für die cDNA-Synthese:

RNase-freies H₂O

Random-Primer

RNase-Inhibitor

dNTPs (10mM)

MV Puffer (5*)

Reverse Transkriptase

Für die Testung mittels β -Actin PCR:

Puffer (+KCl)

MgCl₂ (25mM)

dNTPs (10mM)

β -Actin Primer (sense + antisense jeweils 10 μ M)

Taq-Polymerase

3.3.2 Vorgehensweise

Die Umwandlung von RNA in cDNA bietet den Vorteil gegenüber der Arbeit mit RNA, dass man keine Kontamination mit RNasen und dem daraus folgenden Abbau der gewonnenen RNA befürchten muss. Die Transkription erfolgt durch das Enzym Reverse Transkriptase, indem es von einer Startstelle aus, an der sich die Primer anlagern, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) bindet und somit die cDNA synthetisiert. Üblicherweise stellt man aus der gewonnenen RNA aber nicht nur einen Ansatz mit reverser Transkriptase (+RT), sondern auch einen ohne (-RT) her. Auf diese Art und Weise erhält man eine Kontrolle, ob nicht Verunreinigungen mit genomischer DNA in der RNA-Präparation vorhanden waren.

Vor der cDNA-Synthese wurde die jeweilige Konzentration an RNA bestimmt, um annähernd ähnliche Mengen einsetzen zu können. Hierfür wurden von allen Eluaten 1:50 Verdünnungen aus je 2 μ l RNA und 98 μ l RNase freiem Wasser hergestellt und anschließend mit dem UV-Photometer bei 260nm vermessen.

Für die Synthese wurde letztlich die jeweils errechnete Menge an Eluat verwendet. Die dadurch eingesetzte Menge an RNA entspricht hierbei in den meisten Fällen 4 μ g für die +RT und 1 μ g für die -RT. Konnte diese Menge auf Grund zu geringer Konzentrationen im Eluat nicht erreicht werden, wurde das komplette erhaltene Volumen von 35 μ l benutzt. Zu den verschiedenen RNA-Volumina wurden jeweils 4 μ l Random-Primer gegeben und mit RNase freiem Wasser auf 56 μ l für die +RT und auf 14 μ l für die -RT aufgefüllt. -RT wurde deshalb in geringerem Umfang hergestellt, da es sich hier nur um die Negativ-Kontrolle handelte.

Die hergestellten Ansätze wurden für 5 Minuten zur Anlagerung der Primer bei 70°C inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurden für +RT und –RT Reaktionsansätze hergestellt (Tabelle 3).

Ansatz +RT (X*)	Ansatz –RT (X*)
20µl MV Puffer	5µl MV Puffer
5µl dNTPs	1,25µl dNTPs
4µl RNase Inhibitor	1µl RNase Inhibitor
4µl Reverse Transkriptase	
11µl H ₂ O	3,75µl H ₂ O
→ 44µl	→ 11µl

Tabelle 3: Protokoll für Reaktionsansätze

Anschließend wurden zu den 56µl bzw. 14µl Template die hergestellten 44µl bzw. 11µl MM pipettiert. Die erhaltenen Gesamtvolumina von 100µl (+RT) und 25µl (-RT) wurden dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie für 50 Minuten auf 49°C gehalten und zum Schluss für 15 Minuten auf 70°C erhitzt. Mit der hierdurch erhaltenen cDNA wurde anschließend eine β -Actin PCR durchgeführt. Die PCR ist eine Technik, durch die man in relativ kurzer Zeit DNA amplifizieren kann. Ihr Prinzip beruht auf einer Kettenreaktion, die durch einen Drei-Schritte-Zyklus in Gang gebracht wird und eine exponentiell wachsende Population an Primer-spezifischen DNA-Molekülen produziert. Hierfür wurde jeweils 1µl cDNA als Template eingesetzt und in 27 Zyklen amplifiziert (Tabelle 4).

cDNA Template	1µl
Puffer (10x)	2µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2µl
dNTPs (10 µM)	0,4µl
#sense Primer (10 µM)	1,0µl
#antisense Primer (10 µM)	1,0µl
H ₂ O	13,3µl
Taq-Polymerase (Fermentas)	0,1µl
Endvolumen	→ 20µl

Tabelle 4

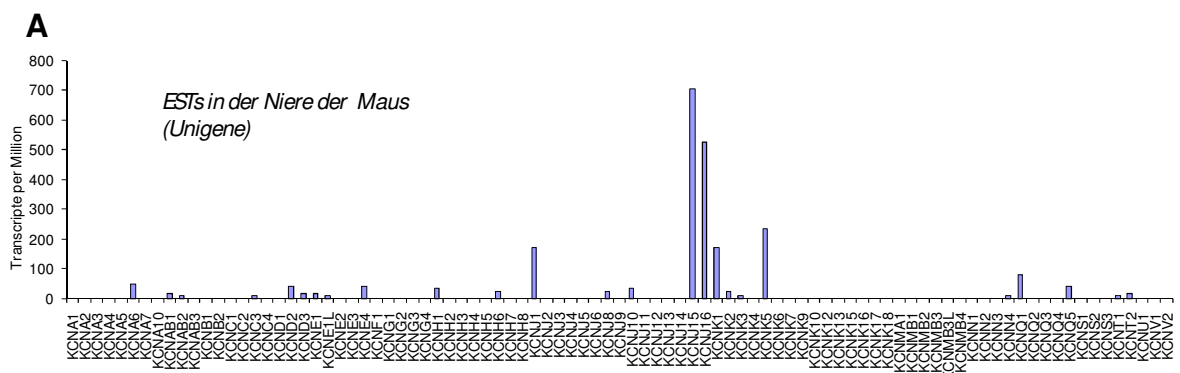
Die Ansätze wurden nach diesem Protokoll sowohl für die +RT als auch für die – RT hergestellt und dann in der PCR-Maschine vervielfältigt. Die 27 Zyklen bestanden jeweils aus den folgenden Schritten: 94°C für 30 Sekunden (Denaturierung), um Einzelstränge zu erhalten, dann Abkühlen auf 58°C für 25 Sekunden (Annealing) um die Primerbindung (mittels Wasserstoff-Brücken) zu ermöglichen. Der dritte Schritt besteht im erneuten Erhitzen auf 72°C für 30 Sekunden (Strangsynthese), um der Taq-Polymerase ihr Temperatur-Optimum für das Anfügen von Nukleotiden zu bieten.

10µl des durch die PCR erhaltenen Produkts wurden mit 2µl Ladepuffer zur Elektrophorese auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen, um zu sehen, ob Amplikons der gewünschten Länge vorhanden waren.

3.4 Primerdesign und Primertestung

3.4.1 Primerdesign

Zunächst wurden die Kaliumkanäle ausgewählt, die vermutlich in der Niere nachzuweisen sind, bzw. von Relevanz sein könnten. Dabei wurde vor allem auf Daten der Unigene-Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) zurückgegriffen. Bei der Recherche und der anschließenden Auswahl wurde zusätzlich berücksichtigt, ob die Kanalproteine sowohl bei der Maus als auch beim Menschen exprimiert werden (Abb. 5).



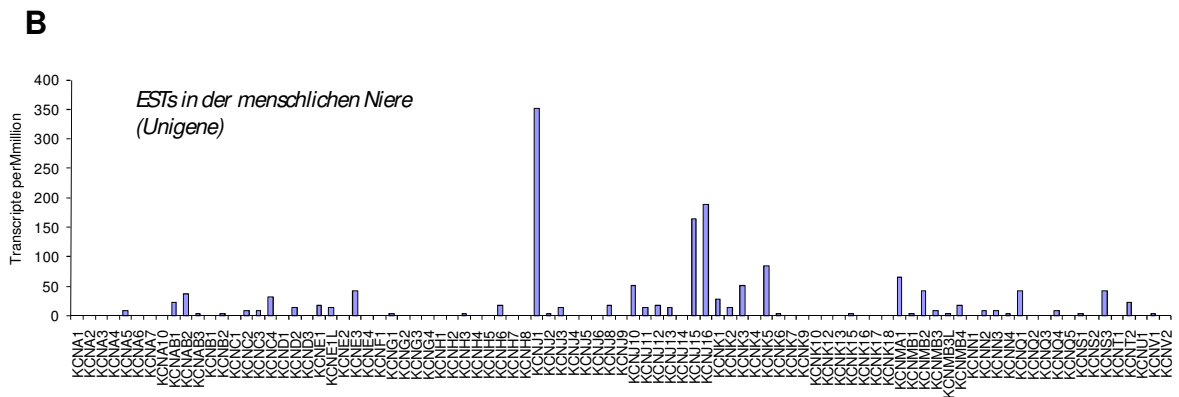


Abb. 5: Vorkommen von "Expressed sequence tags" (ESTs) von Kaliumkanälen in der Niere der Maus (A) und des Menschen (B). Daten sind der Unigene-Database entnommen. Kanäle, die nur in bestimmten Nephronsegmenten vorkommen, z.B. dem Sammelrohr, sind relativ unterrepräsentiert, da in diesem Beispiel der Anteil der Zellmasse der Sammelrohre an der Gesamtmasse der Niere gering ist.

Für die auf diese Weise ausgesuchten Kanäle wurden daraufhin real-time-PCR taugliche Primer entworfen (Tabelle 5). Es wurde darauf geachtet, dass das Amplikon eine Länge von 50-150 Nukleotiden aufweist und dass die Primer über Intron/Exon-Grenzen hinweg reichten, um die Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern. Beim Primerdesign wurde mit verschiedenen Programmen gearbeitet. Zunächst wurden über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> die Nukleotidsequenz der mRNA des jeweiligen Kanals, sowie die Sequenz des jeweiligen Chromosoms gesucht und anschließend mit dem Programm „Spidey“ (unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>) abgeglichen. Anhand dieses Ergebnisses konnte dann mittels der Programme „Gene-runner“ sowie „PCRfast“ ein jeweils geeigneter Primer erstellt werden.

Kanalprot ein	Zugangs-Nr. bei unigene	ermittelte Primersequenz	Annealing-Temperatur	Amplikon
KCNA3	NM_008418	seAGGACGTGTTTGAGGCTG asGTGGAGACCTTGTGCATCA	66.0 °C	100bp
KCNAB1	NM_010597	seAGGGTGTGAGTTCTGTGC asGCAACAAGCCCTACAGCA	64.2 °C	142bp
KCND1	NM_008423	seTCACCATGACCACACTTGG asGGTCATTGCCTTGCCTGT	63.0 °C	110bp
KCND2	NM_019697	seCTGCTTCACTGCCTGGAG asGGAAGTTGCCACCGTCAA	61.8 °C	90bp
KCNE1	NM_008424	seGAGCCTATCACCACAGTCC asCTCCTCCGTTATTACACAC	63.5 °C	158bp
KCNE3	NM_020574	se: TCCTCAAAGATGTCTCAG as: CTGTGCTGAAGGCTCTGA	62.4 °C	149bp
KCNH1	NM_010600	se: TCCCTGGAGGTGATCCAG	64.8 °C	100bp

		as: GCTACCCTTGCACAGTCC		
KCNH2	NM_013569	se: GTGGGCTTTGGCAATGTC as: CAACGTGTCCGCCATCAT	64.2 °C	117bp
KCNJ1	NM_019659	se: TGCTTCAGATCGGAGGTG as: GCAAGGTTGGTCTCCA AAG	63.5 °C	135bp
KCNJ3	NM_008426	se: AACAGCCACATGGTCTCC as: GAGGGTGAGTTCCTTCCC	64.2 °C	79bp
KCNJ8	NM_008428	se: GAAGAGTGGCCTGGAGTC as: CTGGCCATCACGGTTTTG	65.1 °C	146bp
KCNJ15	NM_019664	se: TAGCCAGGTGGGAGAAGG as: CACCTTGGCATGTCCAGT	65.1 °C	108bp
KCNJ16	NM_010604	se: TACAGCCGACCATTGGAC as: CTGAATGCCCTAAAGGAC	59.3 °C	118bp
KCNK1	NM_008430	se: CAGGGGAAGGCTACAACC as: GCTGGTTGTCTCGGAGAC	64.3 °C	101bp
KCNK2	NM_010607	se: TCACTGGGACCTCGGAAG as: CCACGAACTGAAGGTGGA	61.6 °C	92bp
KCNK5	NM_021542	se: GCTTTGGGGACTTTGTGG as: GCTTGGCTGTCCCTCTTT	65.1 °C	111bp
KCNMA1	NM_010610	se: AAGGCCTCTCCACAATGC as: GACACATGGCAGAAATACT	58.1 °C	82bp
KCNMB2	NM_028231	se: GCAGGTGTACGTGAACCTG as: TCCATGACGACACTCAGC	62.0 °C	150bp
KCNMB4	NM_021452	se: ATGAGATCGGTTCCAGC as: CGAGATTGCTCTCCTGCA	62.8 °C	101bp
KCNN4	NM_008433	se: GTCAGGAGGCCACATAGC as: GCTCAAGGACATGCTCCC	63.5 °C	83bp
KCNQ1	NM_008434	se: ACTTCAACCGGCAGATCC as: GGAGTCACACGCTTCTGT	66.0 °C	133bp
KCNQ5	NM_023872	se: GGGCACAATCACACTG as: GAATGCCAGCAGGAAG	62.0 °C	125bp
KCNS3	NM_173417	se: TCCACTGTGCAGGATGAG as: ATCTTGTCCAGGGCGATG	62.0 °C	146bp-
SGLT1	NM_019810	se: TAATCGTGGTACCGTTGGAG as: CTGCTCCTGTGCCTGCCA	62.0 °C	128bp
SGLT2	NM_133254	se: GCAACATCGGCAGCGGTC as: GGTCAGATACACTGGCACAA	62.0 °C	137bp
NKCC2	U20974	se: TCTGCATCTGCTGCGAAG as: GGACACCGTCCCTGAAGC	62.0 °C	153bp
Alpha-ENaC	NM_011324	se: GGTGCACGGTCAGGATGAG as: TAGTTGCCTCCGAGGCTGTC	62.0 °C	117bp

Tabelle 5: Liste der relevanten Primer

3.4.2 Primertest

Zunächst wurden die Primer unter verschiedenen Bedingungen ausgetestet, um ein optimales Ergebnis zu erhalten. Die variierten Parameter der hierfür durchgeführten PCR-Läufe bestanden in der Zahl der Zyklen, der jeweiligen Dauer der Zyklen und der Annealingtemperatur (beispielhaft in Abb. Nr. 6 dargestellt; die hohen Banden im Bereich von 1kB stellen unspezifische Reaktionen dar).

Zuerst wurde als Template ein Standard-Gemisch aus cDNA von Cerebrum, Cerebellum, Trachea, Rückenmark, Herz, Lunge, Leber, Milz, Cortex, Medulla, Papille, Magen, Colon, Jejunum, Ileum, Duodenum, Muskel, Pankreas sowie Schwanzknorpel eingesetzt. Dies erwies sich für einige Kanäle als problematisch, wenn Kanalproteine fast ausschließlich in der Niere exprimiert waren. Bei dieser Mischung konnten also nur schwach, aber dennoch vorhandene Kanäle aus dem Raster fallen, was vermieden werden sollte. Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein cDNA-Gemisch verwendet, welches nur aus cDNA von Niere und Gehirn einer erwachsenen Maus bestand. Gehirn wurde gewählt, weil einige der Kanäle laut Literatur besonders im neuronalen Gewebe exprimiert werden.

Grundsätzlich wurde für diese Primertests folgendes Protokoll benutzt (Tab. 6).

Primer (se+as) (10µM)	je 1µl
Template (cDNA Maus)	1µl
MgCl ₂ (50mM)	0,6µl
Puffer (10x)	2µl
Eurobio-Taq	0,1µl
dNTPs (10mM)	0,4µl
H ₂ O	14,9µl
Endvolumen	→ 20µl

Tabelle 6

PCR-Programm:

- | | |
|-------------------|-------------|
| 1. 94°C für 30sec | } 40 Zyklen |
| 2. 60°C für 30sec | |
| 3. 72°C für 30sec | |

Der 2. Schritt wurde um +/-5 Sekunden, der 3. Schritt um bis zu -15 Sekunden und die Zyklenzahl um +/-5 variiert.

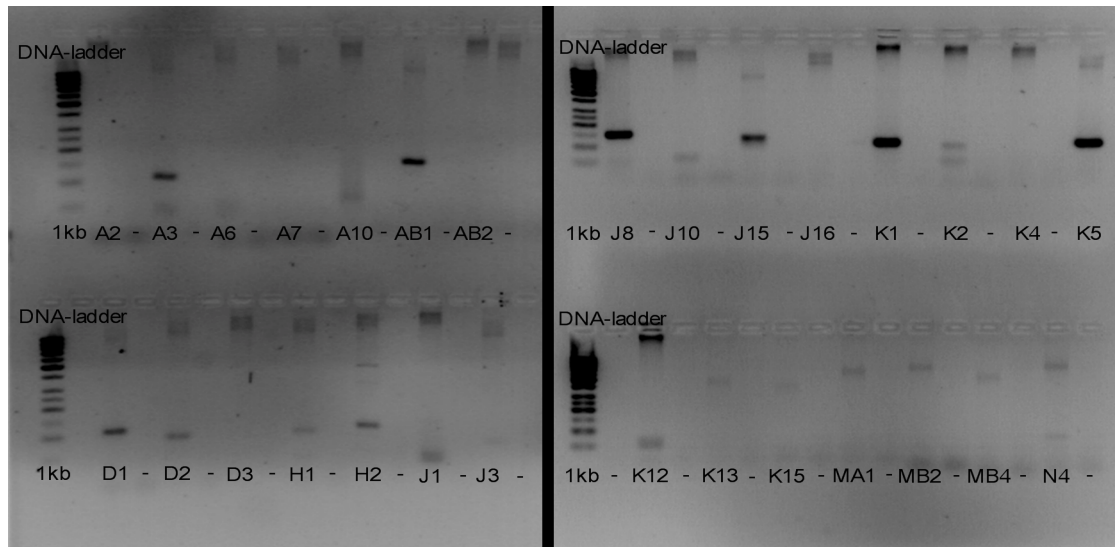


Abb. 6: Primertest mit cDNA (gesamt) Maus WT (β/η gemischt); die Negativprobe (ohne cDNA) wurde jeweils mit – gekennzeichnet. A2, A3 usw. steht jeweils für KCNA2 bzw. KCNA3 usw. Spezifische Spuren finden sich in diesem Lauf für KCNA3, KCNAB1, KCNJ8 und -15, KCNK1 und -5, KCND1 und -2, KCNH1 und -2.

Hierbei stellte sich heraus, dass nicht alle Primer dazu geeignet waren, verlässliche Aussagen über die Expression des jeweiligen Kanals zu erhalten. Aus diesem Grund wurde eine Auswahl getroffen, die in Tabelle 5 bereits dargestellt wurde.

3.5 Real-Time PCR

3.5.1 Chemikalien und Gerät

Die Light-Cycler PCR wurde mit QuantiTect™ SYBR® Green PCR durchgeführt:

2x QuantiTect SYBR Green PCR-Mix	10µl
Primer (se+as; 10µM)	je 1µl
cDNA	1µl
Wasser	7µl

Einsatz des Light-Cyclers der Firma Roche

3.5.2 Vorgehensweise

Mit Hilfe der Real-Time PCR können DNA-Stücke in relativ kurzer Zeit amplifiziert und gleichzeitig mittels Messung der Fluoreszenz Aussagen über die Quantität getroffen werden. Hier wurde die PCR mit dem Light-Cycler-Gerät der Firma Roche durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein geschlossenes System mit Glaskapillaren als Reaktionsgefäße.

Das Prinzip der Real-Time PCR entspricht ziemlich genau dem der herkömmlichen PCR. Zunächst erfolgt die Denaturierung des Ansatzes bei etwa 95°C, um die DNA in ihre Einzelstränge zu zerlegen. Danach wird die Temperatur auf die jeweilige von der Primer-abhängige Annealing-Temperatur abgesenkt. Bei dieser binden die beiden genspezifischen Primer spezifisch an die komplementäre Sequenz der Proben-DNA. Im Anschluss an das Annealing wird die Temperatur wieder auf 72°C erhöht. Dies entspricht dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase und die angelagerten Primer werden in 3'-Richtung verlängert. In dieser Phase kommt bei der im Light-Cycler durchgeführten PCR der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff zum Tragen. SYBR Green I bindet an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle und zeigt nach DNA-Bindung ein Fluoreszenzsignal, dessen Intensität von der Menge an doppelsträngiger DNA abhängig ist und gemessen wird. Anschließend beginnt der nächste Zyklus mit der Denaturierung der Doppelstränge. Zur Auswertung wurde die relative Expression im Vergleich zu β -Actin ermittelt. Dabei wurde folgende Formel zur Berechnung der normalisierten Genexpression eingesetzt [51]:

$$NE = \frac{(E_{target})^{CT_{target}}}{(E_{ref})^{CT_{ref}}}$$

NE : normalisierte Genexpression, E_{target} : Effizienz der Vervielfältigung des Zielgens, E_{ref} : Effizienz der Vervielfältigung des Referenzgens, CT_{target} : Zyklus bei dem die Fluoreszenz des Zielgens die Hintergrundfluoreszenz merkbar übersteigt, CT_{ref} : Zyklus bei dem die Fluoreszenz des Referenzgens die Hintergrundfluoreszenz merkbar übersteigt.

Die Analyse erfolgte über die Software *q-gene* von Biotechniques (<http://www.gene-quantification.de/download.html>) auf der Grundlage der oben genannten Formel.

3.6 Schnitte und Immunfluoreszenzfärbungen

3.6.1 Schnitte

Als Material wurden die bereits beschriebenen Nieren verwendet. Nach Einbettung in Tissue-Tec wurden aus den bei -80 °C aufbewahrten Organen 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht, die anschließend bei -20 °C aufbewahrt wurden. Beim Anfertigen der Schnitte wurde darauf geachtet, die anatomischen Strukturen so zu schneiden, dass alle relevanten Bereiche auf einem Schnitt vorhanden waren. Man sollte also die Aufteilung in Cortex, Medulla und Papille möglichst gut erkennen können.

3.6.2 Chemikalien für Immunfluoreszenzfärbung

PBS-Puffer (137mM NaCl, 1,8mM KH₂PO₄, 10,3mM Na₂HPO₄; pH7,4)

0,1% SDS

PBS + 5% Albumin

PBS + 0,04% Triton X 100

1 ° Antikörper: ROMK (Alomone), KCNQ1 (H130, St. Cruz), SGLT1 (St. Cruz)

2 ° Antikörper: alexa 488 und alexa 546 (Invitrogen)

3.6.3 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Epitopdemaskierung wurden die Schnitte für 5 Minuten in PBS mit 0,1% SDS gestellt und im Anschluss daran für 15 Minuten in PBS mit 5% Albumin geblockt. Danach wurden die Schnitte noch ein weiteres Mal für 5 Minuten in

PBS gegeben. Die Objektträger (OT) wurden daraufhin umfettet und mit dem primären Antikörper benetzt (300µl/OT).

Zusammensetzung der 1° Antikörper-Verdünnung (Tabelle 7):

Antikörper	Verhältnis I	Verhältnis II
ROMK1	1:500	1:500
KCNQ1	1:500	1:500
SGLT1	1:250	1:500

Tabelle 7

In einer mittels PBS-Puffer erzeugten feuchten Kammer wurden die Schnitte zur Anlagerung des 1° Antikörpers über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Als nächstes wurden die überschüssigen Antikörper abgewaschen, indem die Objektträger zweimal für jeweils 5 Minuten in PBS gegeben wurden. Dann wurden der sekundäre Antikörper sowie ein Kernfarbstoff (Hoe33342) und ein den Bürstensaum anfärbender Farbstoff (Phalloidin) aufgetragen.

Der 2° Antikörper wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur und wegen des Fluoreszenzfarbstoffs im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde erneut für 5 Minuten in PBS gewaschen und vor dem Mounten (Glycergel, Dako) kurz mit Aqua dest. gespült.

4. ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Real-Time Analyse

Auf den folgenden Seiten erfolgt die graphische Darstellung der mittels Real-time-PCR gewonnenen Ergebnisse. Die einzelnen Graphen wurden nach der durch die Analyse ermittelten Expressionsveränderung im Laufe der Entwicklung geordnet. Es handelt sich um die relative Expression zu beta-Actin. Der Vergleich der Expressionsstärke der verschiedenen Kanäle ist jedoch problematisch, da aufgrund der exponentiellen Reaktion und der schwierigen

Ermittlung der jeweiligen Amplifikationseffizienzen Fehler unvermeidlich sind. Der Vergleich der Expressionsstärke eines Genes zu verschiedenen Zeitpunkten (z.B. 20 Tage vs. 60 Tage) oder in verschiedenen Bereichen der Niere (z.B. Cortex vs. Papille) ist relativ präzise, der Vergleich der Expressionsstärke verschiedener Gene (z.B. KCNE1 vs. KCNE3) aber, wie bereits gesagt, nur als ungefähre Anhalt zu verstehen.

4.1.1 Kaliumkanäle und Transportproteine, deren Expression im Verlauf der Entwicklung zunimmt

Für die Kaliumkanäle KCNA3, KCNE1, KCNE3, KCNH1, KCNJ1, KCNJ3, KCNJ15, KCNJ16, KCNK1, KCNK5, KCNMA1 und KCNQ1 (Abb. 7 – 20) beobachtete ich, dass deren Expression im Vergleich zu β -Actin mit zunehmendem Alter steigt. Das parallel dazu untersuchte Verteilungsmuster innerhalb der Nieren der 20 bzw. 60 Tage alten Versuchstiere war dabei jedoch Gen-abhängig unterschiedlich. Auch weitere bekannte Transportproteine zeigten eine altersabhängige Zunahme der Expression (NKCC2, SGLT1, SGLT2 und α -ENaC: Abb. 21-26). Dies spricht dafür, dass diese Proteine für die spezifischen Transportfunktionen der differenzierten Tubuluszellen wichtig sind, nicht aber für Wachstum und Proliferation.

Im Folgenden werde ich die Expressionsdaten der untersuchten Kanäle und Transporter darstellen.

KCNA3

Bei KCNA3 (Abb. 7) war bei den 20 Tage alten Versuchstieren die stärkste Expression im Bereich der Medulla zu beobachten, wohingegen sich diese bei den adulten Tieren in Richtung des Cortex verschiebt.

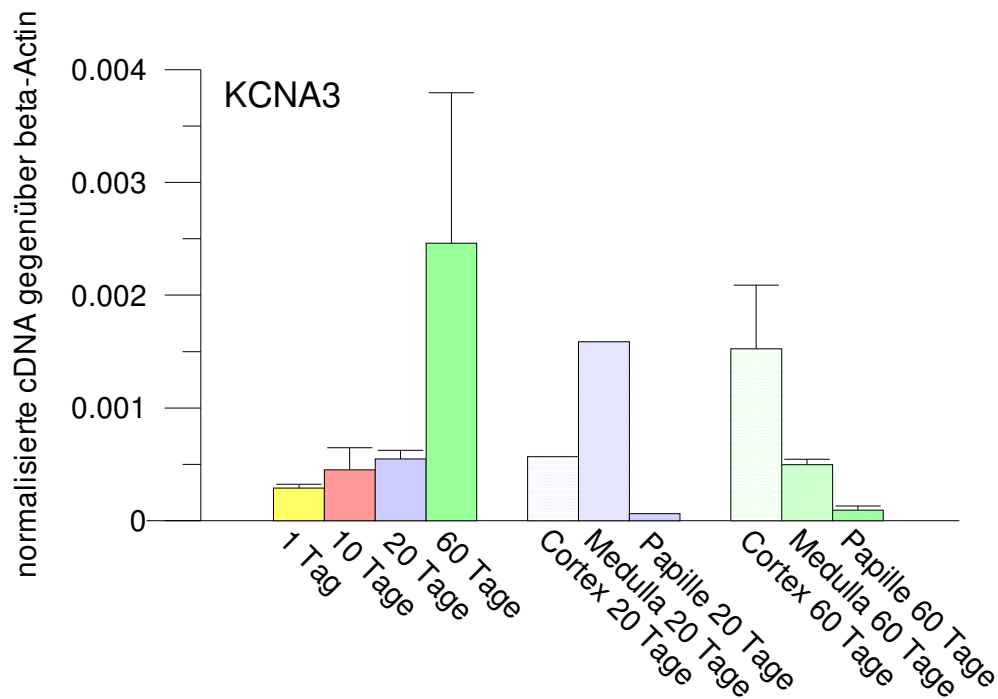


Abb. 7: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNA3 mittels Realtime-PCR. Die Daten wurden zu beta-Actin als "Housekeeper"-Gen normalisiert. Für die ersten vier Säulen wurde mRNA aus ganzen Nieren isoliert. Dargestellt ist der Mittelwerte der jeweiligen Altersgruppe mit n=4 für 1, 10 und 20 Tage und n=3 für 60 Tage. Die nächsten 6 Säulen zeigen die Genexpression in Cortex, Medulla und Papille für 20 Tage alte und 60 Tage alte Tiere. Bei den 20 Tage alten Tieren wurden Cortex, Medulla und Papille gepoolt, daher ist hier kein Fehlerbalken dargestellt. Wo gezeigt, entspricht der Fehlerbalken dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

KCNE1

KCNE1 wies das größte Signal im Bereich des Cortex auf und ist in der Papille nur sehr gering exprimiert (Abb. 8). KCNE1 ist eine beta-Untereinheit des KCNQ1. Das Fehlen von KCNE1 soll bei der Knockoutmaus zu einem renalen Natriumverlust führen [66].

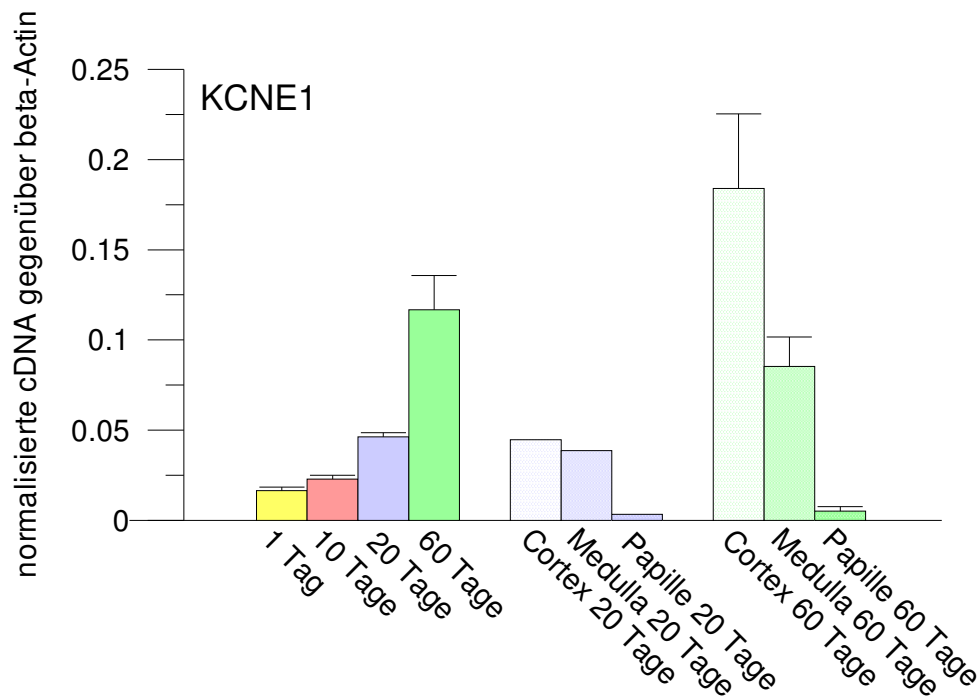


Abb. 8: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNE1

KCNE3

Auch KCNE3 (Abb. 9) zeigt, zumindest für die adulte Maus, einen hohen Anteil im Cortex. KCNE3 ist ebenfalls eine beta-Untereinheit des KCNQ1, ein renaler Phänotyp wurde bei der Knockoutmaus allerdings nicht beobachtet [55].

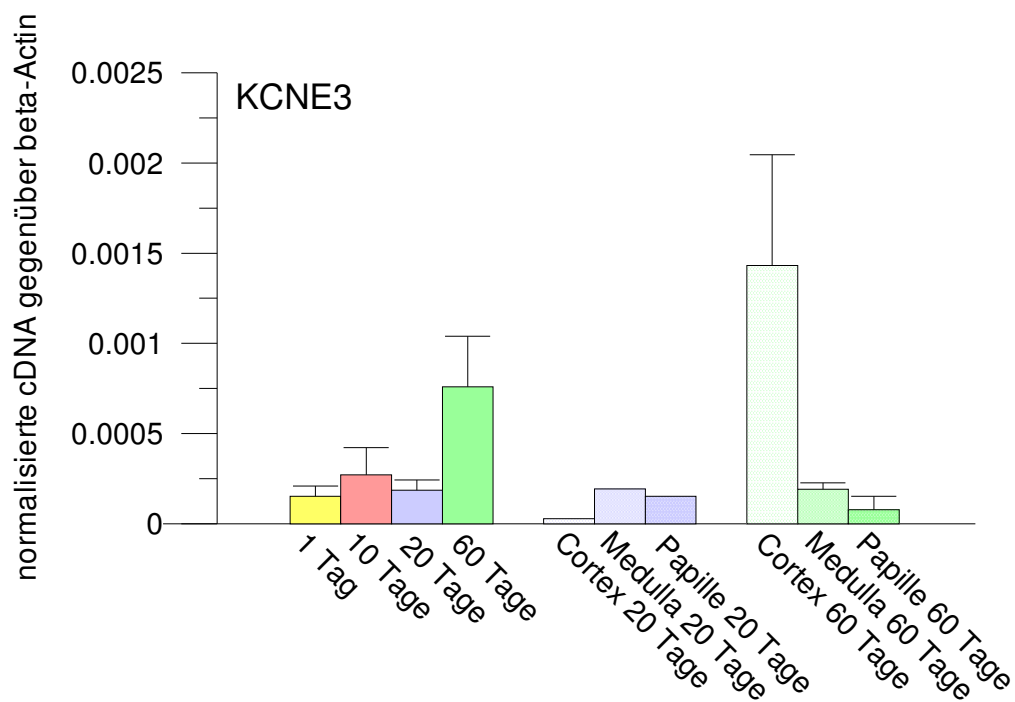


Abb. 9: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNE3.

KCNH1

KCNH1 zeigt ebenfalls die stärkste Expression im Cortex der 60 Tage alten Niere, wobei hier die medulläre Expression ähnlich stark ausgeprägt ist (Abb. 10).

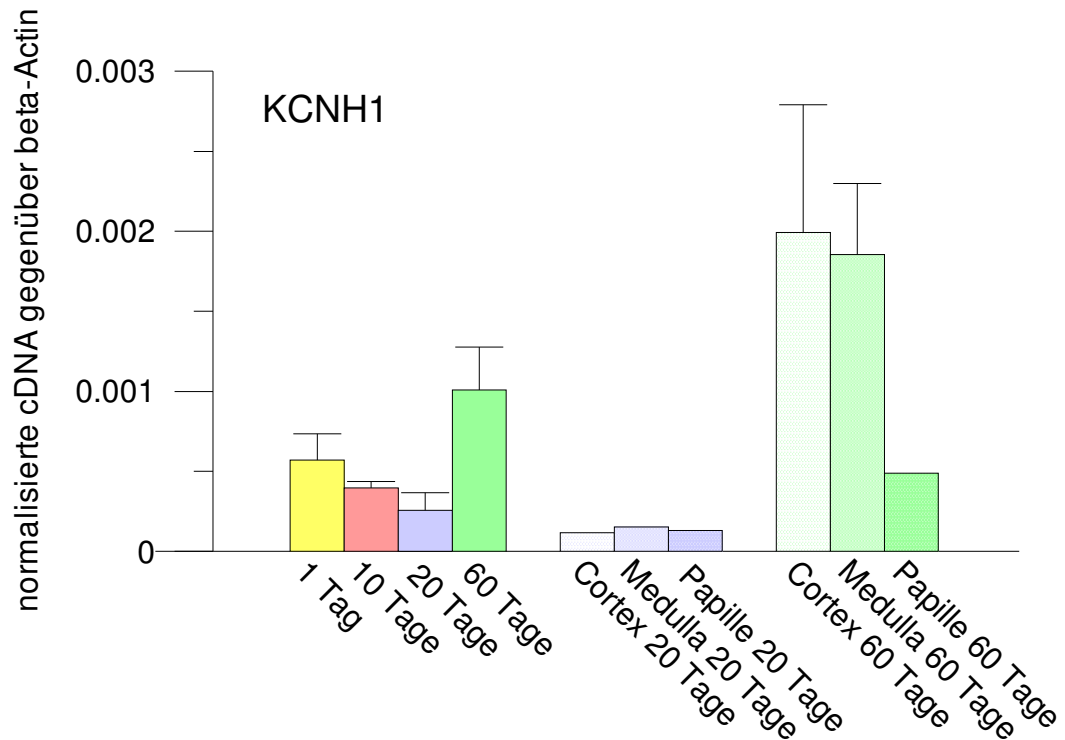


Abb. 10: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNH1.

KCNJ1 (ROMK)

KCNJ1 ist bekanntermaßen einer der am stärksten exprimierten Kaliumkanäle in der Niere, und Mutationen des ROMK sind für das Barter-Syndrom Typ II verantwortlich.

Er ist vor allem in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife und schwächer im distalen Nephron exprimiert (Abb.12). In Übereinstimmung mit diesen Literaturdaten beobachtete ich die höchste mRNA-Expression im Nierenmark (Abb. 11). Auch bei KCNJ1 nimmt die Expression mit dem Alter der Tiere zu.

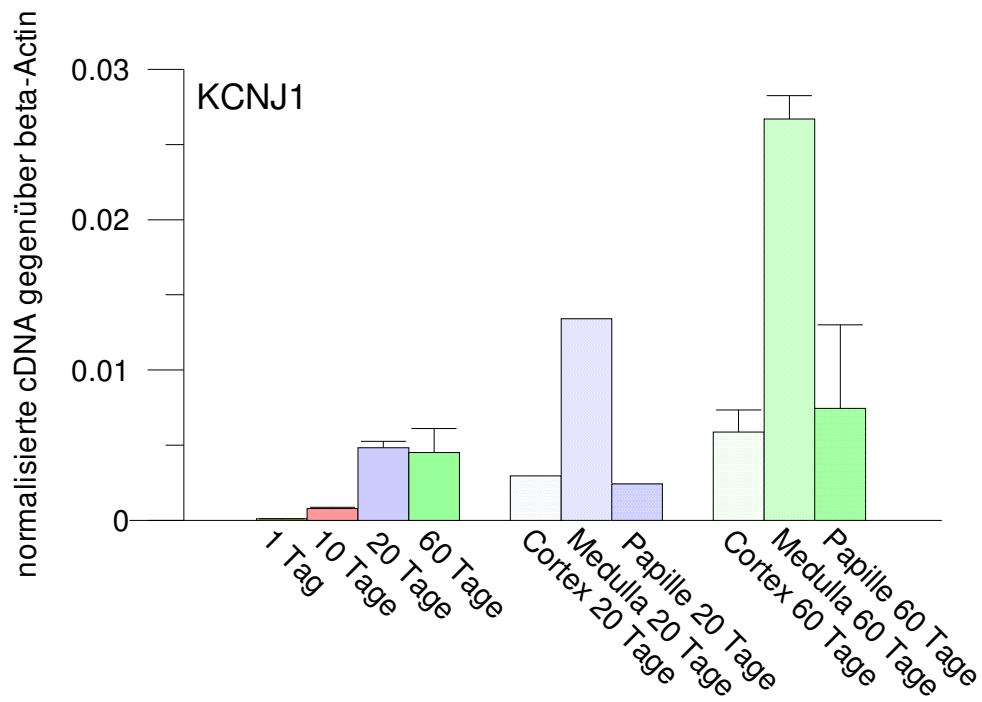


Abb. 11: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNJ1.

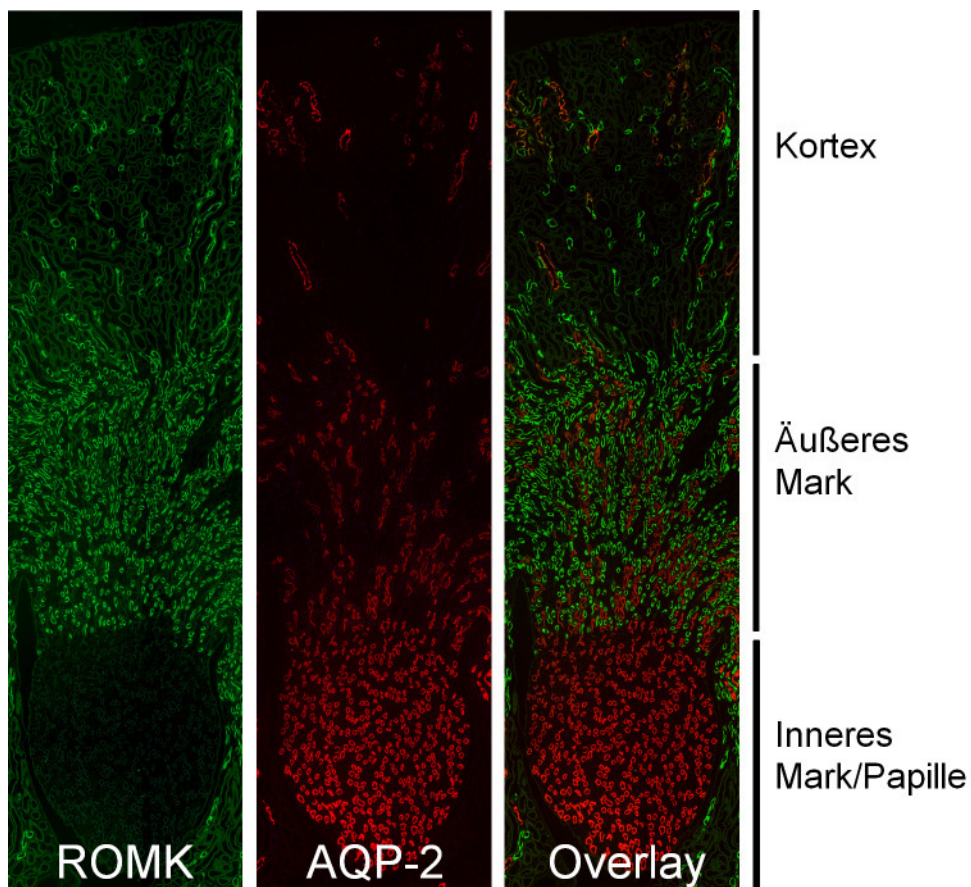


Abb. 12: Immunfluoreszenzfärbung. ROMK (KCNJ1) (grün), Aquaporin2 (rot). Maus WT♂, 60d. (Schnitte wurden von Dr. Bandulik aus unserer Arbeitsgruppe angefertigt).

KCNJ3

Die Verteilung des Einwärtsgleichrichters KCNJ3 scheint bei der 20 Tage alten Maus noch relativ gleichmäßig zu sein (Abb.13). Mit zunehmendem Alter findet man KCNJ3 jedoch hauptsächlich im Cortex. Insgesamt ist die Expression eher gering ausgeprägt

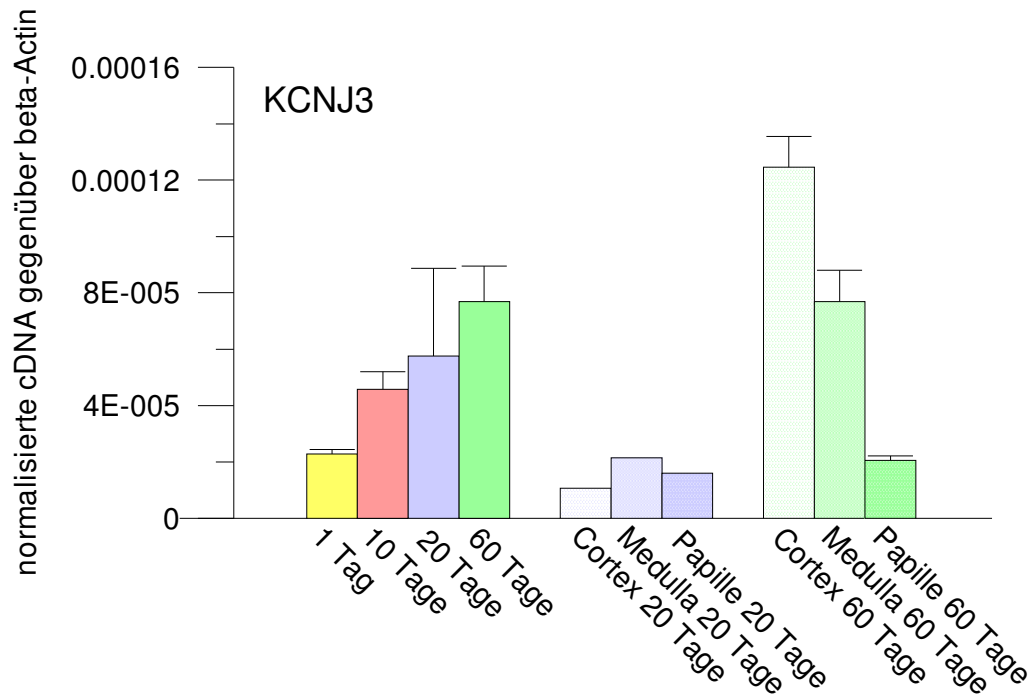


Abb. 13: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNJ3.

KCNJ15

Neben KCNJ1 ist KCNJ15 einer der am stärksten in der Niere exprimierten Kanäle. Interessanterweise ist allerdings über seine Lokalisation und Funktion in der Niere bislang nur sehr wenig bekannt. Vermutlich ist KCNJ15 ein basolateraler Kanal im proximalen Tubulus. Es ist daher nicht verwunderlich, dass seine stärkste Expression im Cortex gefunden wurde (Abb. 14).

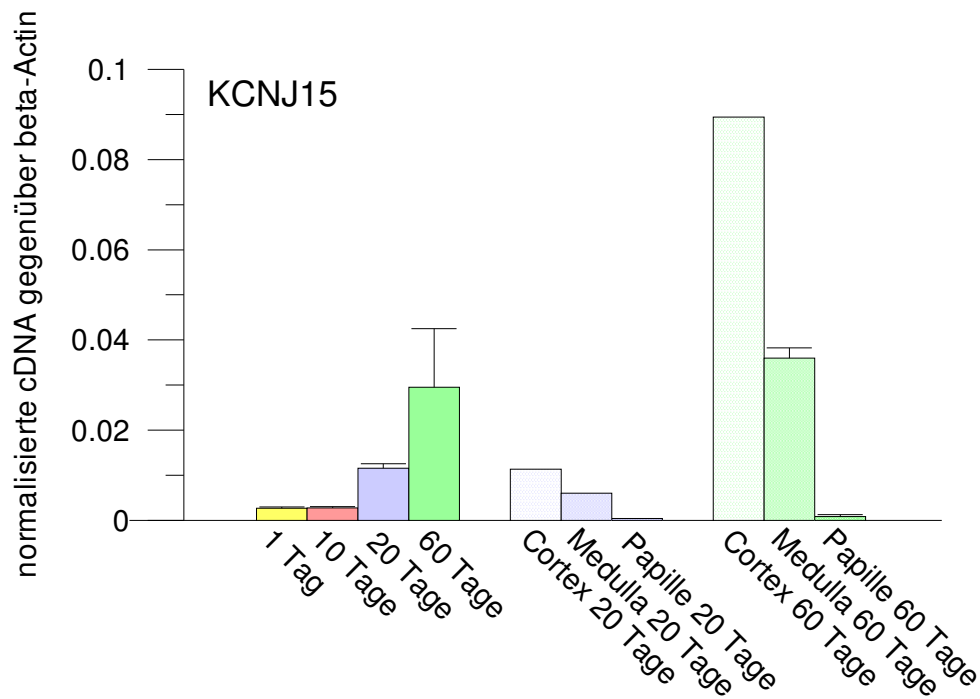


Abb. 14: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNJ15.

KCNJ16

KCNJ16, welcher vermutlich Heteromere mit KCNJ10 und KCNJ16 bildet, zeigte ein ähnliches corticales Expressionsmuster wie KCNJ15, wenngleich das Niveau der Expression sicherlich deutlich geringer war (Abb. 15).

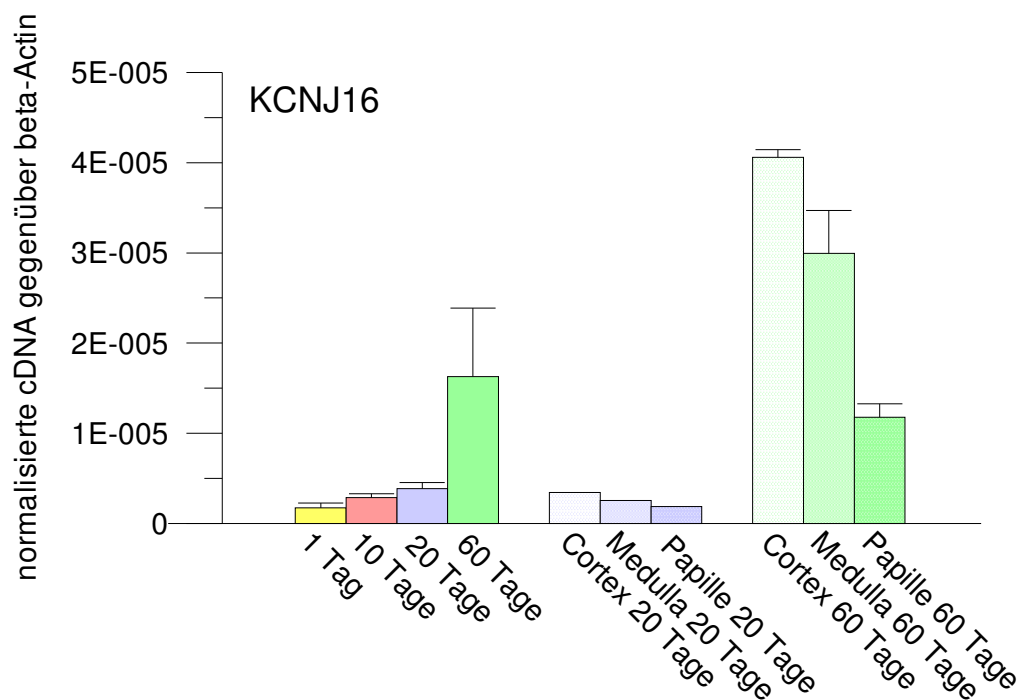


Abb. 15: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNJ16.

KCNK1 (TWIK1)

Das Kanalprotein KCNK1 soll in proximalen Tubuli an der Phosphatresorption beteiligt sein. Allerdings fand ich bei meinen Untersuchungen die stärkste Expression im Bereich der Medulla (Abb. 16), was durch eine Expression in späten proximalen Tubuli (S3-Segment) erklärbar wäre, da diese sich im äußeren Mark befinden.

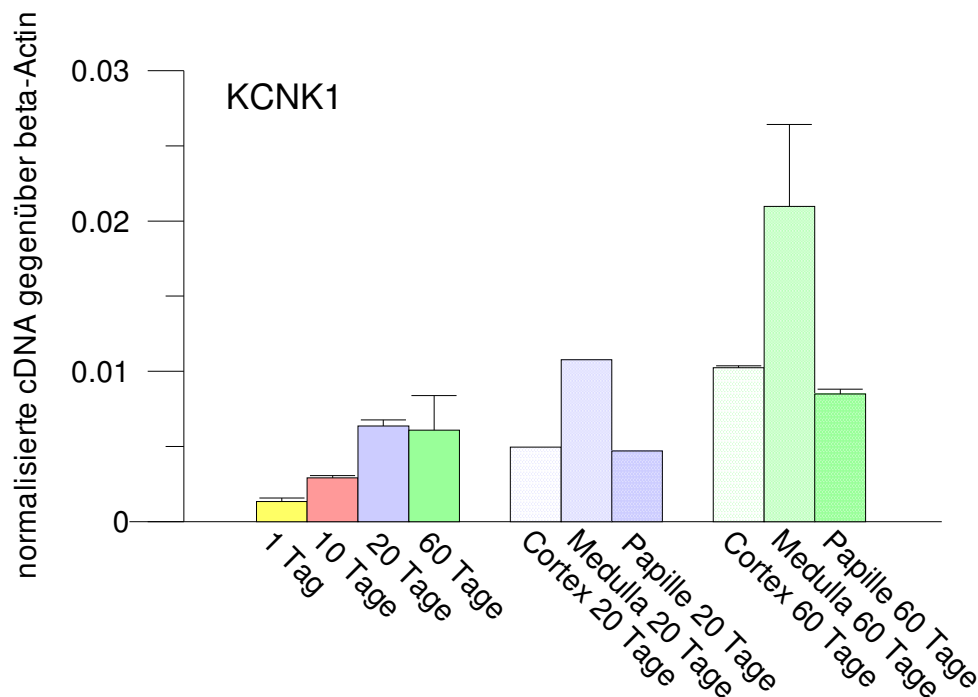


Abb. 16: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNK1.

KCNK5 (TASK2)

Es ist bekannt, dass KCNK5 in proximalen Tubuli die Bikarbonatresorption fördern soll, indem er ein negatives basolaterales Membranpotential etabliert [70]. Auffällig bei meinen Untersuchungen war die starke Expression in der Papille der 20 Tage alten Tiere (Abb.17). Diese Lokalisation war zwar prinzipiell bekannt, die Funktion des Kanals in der Papille ist jedoch gänzlich unbekannt.

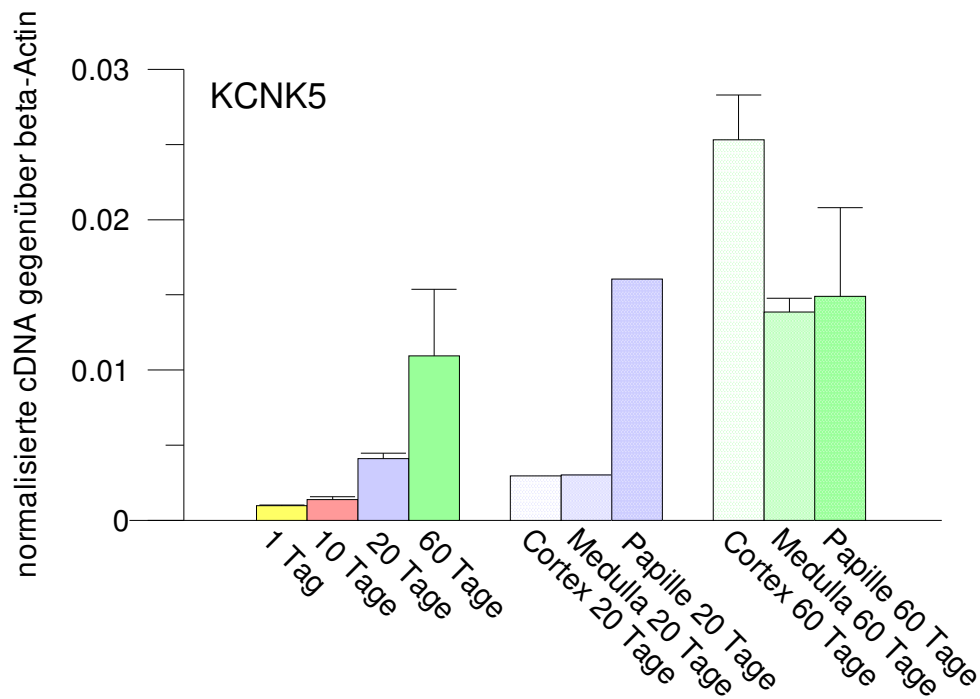


Abb. 17: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNK5.

KCNMA1 (MaxiK=BK alpha-Untereinheit)

KCNMA1 soll ein entscheidender Kanal für die Fluss-induzierte Kaliumsekretion des Sammelrohres sein [75]. Für KCNMA1 zeigt sich, dass mit zunehmendem Alter der Anteil in Cortex und Medulla stark zunimmt, was für die effizientere Kaliumsekretion in der reifen, adulten Niere spricht (Abb. 18).

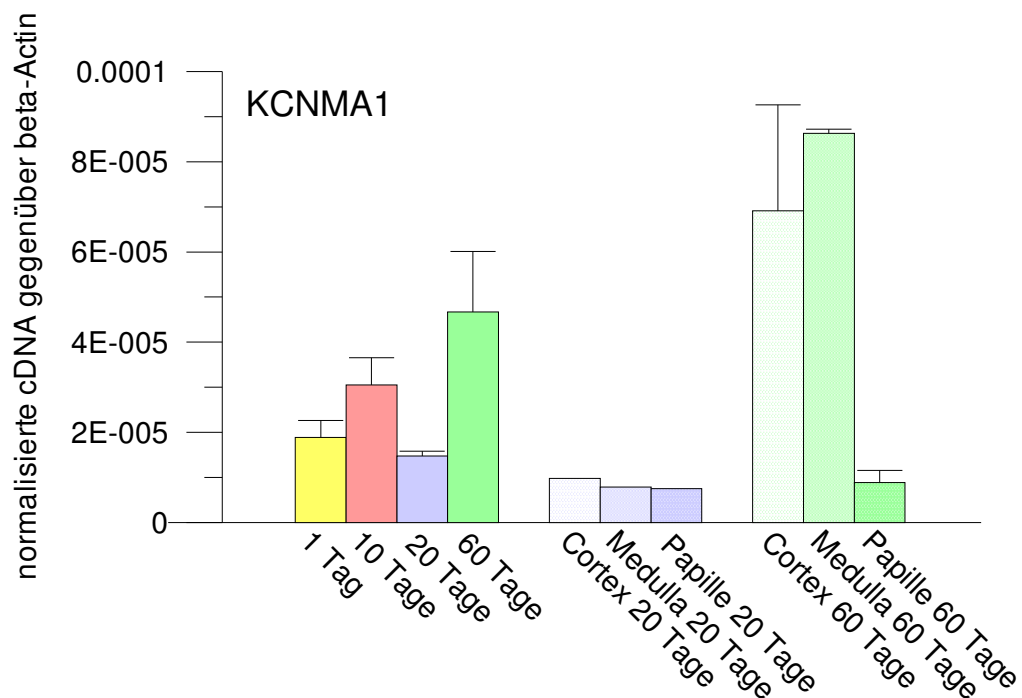


Abb 18: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNMA1.

KCNQ1

Die renale Funktion von KCNQ1, der alpha-Untereinheit, die mit den oben beschriebenen KCNE1 und KCNE3 beta-Untereinheiten assoziiert ist, ist bisher noch weitgehend unbekannt. Auch die Knockoutmaus zeigt keinen richtungsweisenden Phänotyp [67].

Meine Untersuchungen der mRNA-Expression sprechen für eine deutliche Altersabhängigkeit der Expression von KCNQ1 (Abb. 19 und 20), die jedoch insgesamt nicht sehr hoch ist.

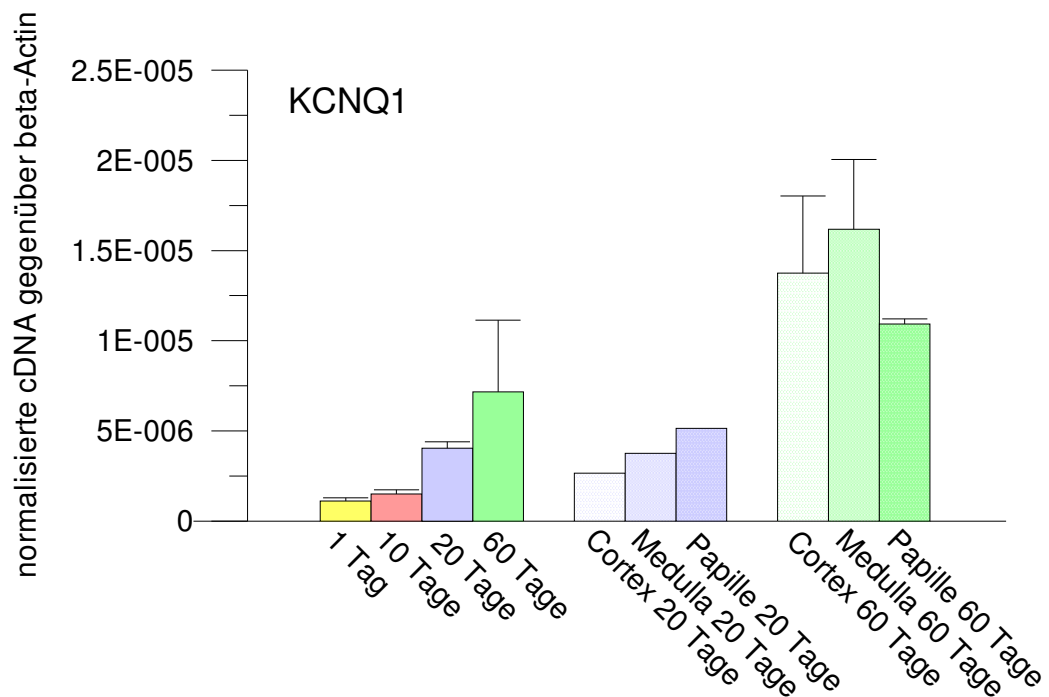


Abb. 19: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNQ1.

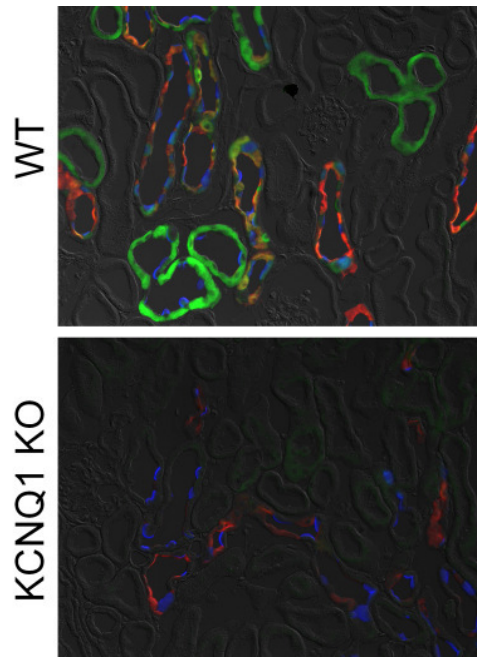


Abb. 20: Immunfluoreszenzfärbung. KCNQ1 (grün), Pendrin (blau), H^+,K^+ -ATPase (rot). In der Wildtypmaus (WT) färbt KCNQ1 Sammelrohrzellen an, in der KCNQ1-Knockoutmaus (KCNQ1 KO) hingegen nicht (Schnitte wurden von Dr. Bandulik aus unserer Arbeitsgruppe angefertigt).

Segmentspezifische Transportproteine

Proximaler Tubulus: Die Glucosetransporter SGLT1 und SGLT2

Entsprechend den Literaturdaten konnte für SGLT1 eine deutliche Expression in Cortex und Medulla gezeigt werden (Abb. 21 und 22). Dabei findet sich ein leichtes Überwiegen im Mark. Dies ist bedingt durch die Lokalisation von SGLT1 im späten proximalen Tubulus, besonders im S3-Segment der äußeren Medulla. Wie für die zuvor genannten Kaliumkanäle ist die Expression deutlich altersabhängig.

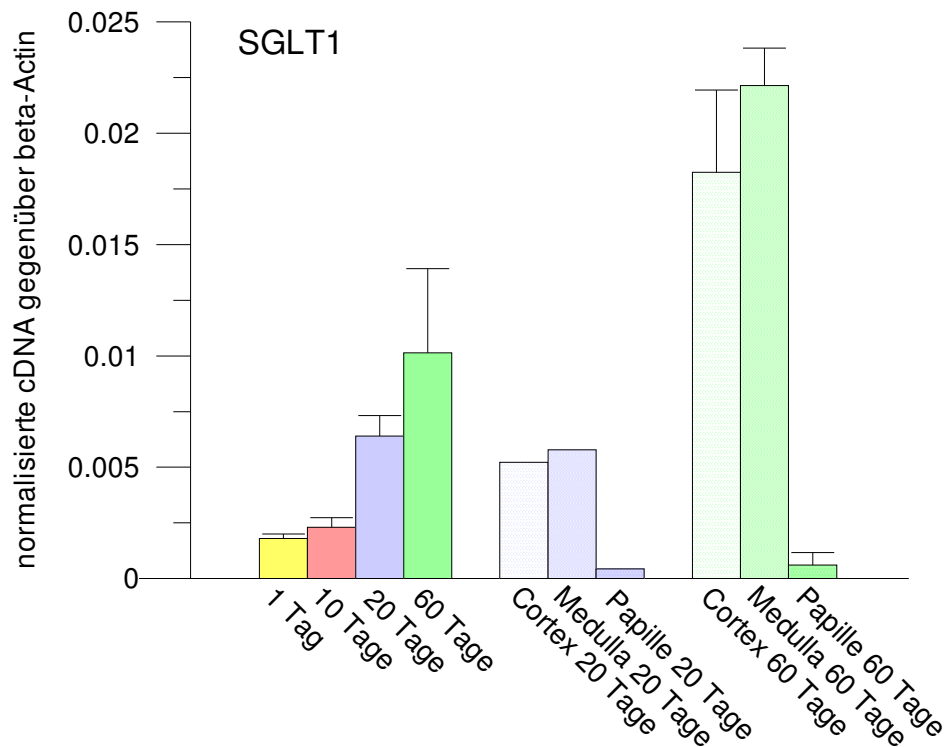


Abb. 21: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von SGLT1.

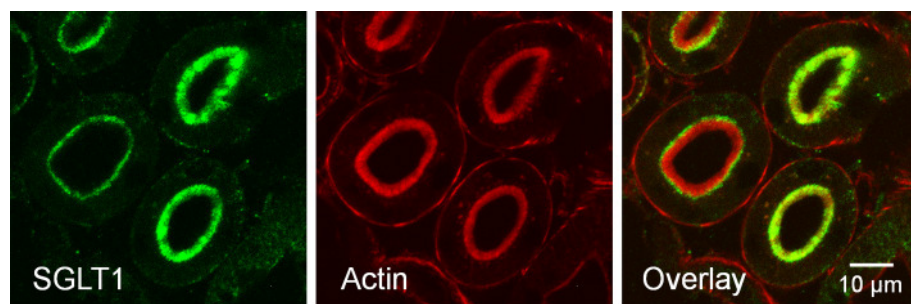


Abb. 22: Immunfluoreszenzfärbung. SGLT1 und Actin in proximalen Tubuli der Maus. Besonders im späten proximalen Tubuli ist SGLT1 im Bürstensaum lokalisiert. (Schnitte wurden von Dr. Reichold aus unserer Arbeitsgruppe angefertigt).

SGLT2

Der Natrium-abhängige Glucosetransporter der frühen proximalen Tubuli (S1 und S2) war wie erwartet hauptsächlich im Cortex der adulten Maus zu finden (Abb 23). Auch hier war die Altersabhängigkeit der Expression deutlich.

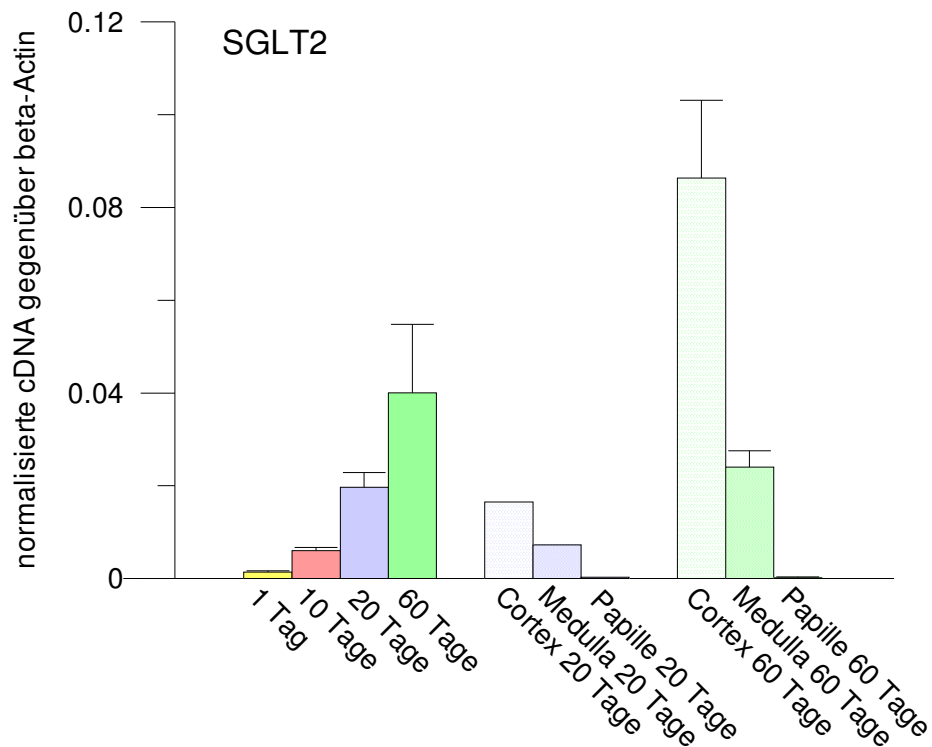


Abb. 23: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von SGLT2.

Der $\text{Na}^+2\text{Cl}^-\text{K}^+$ -Kotransporter (NKCC2)

NKCC2 war in der Niere der adulten Maus sehr stark exprimiert und wie erwartet vor allem in der Medulla abgebildet (Abb. 24 und 25), da er ausschließlich in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife anzutreffen ist.

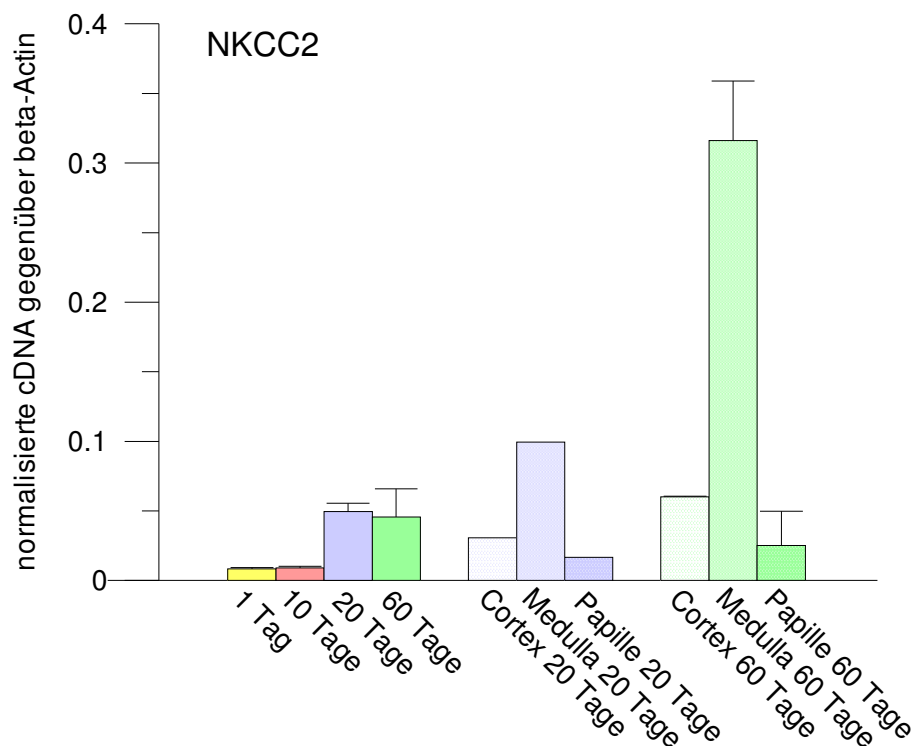


Abb. 24: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von NKCC2.

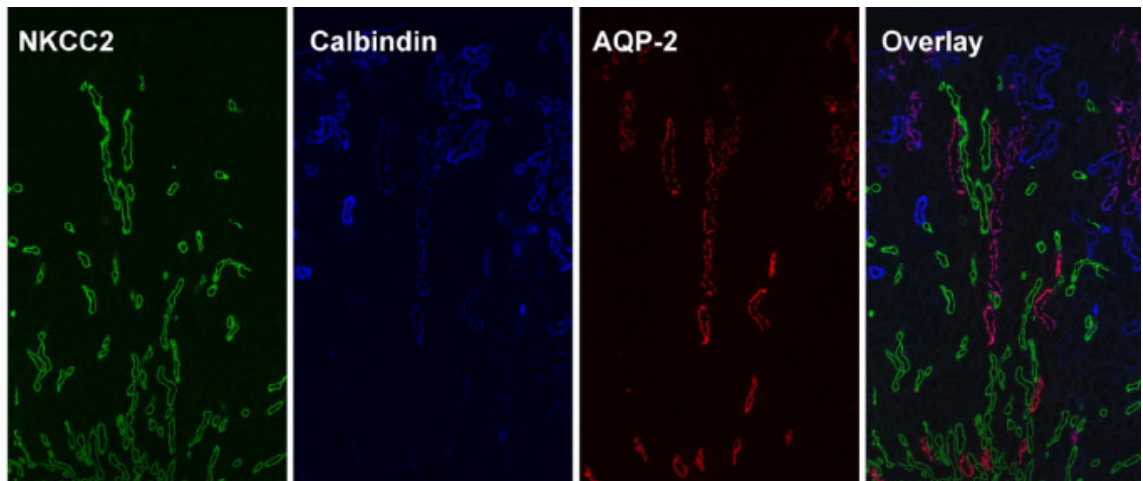


Abb. 25: Immunfluoreszenzfärbung von NKCC2 (grün), Calbindin (blau), AQP (rot). (Schnitte wurden von Dr. Reichold aus unserer Arbeitsgruppe angefertigt).

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) des distalen Nephrons

α ENaC wurde sowohl bei den 20 Tage als auch bei den 60 Tage alten Mäusen hauptsächlich in Rinde und Mark exprimiert (Abb. 26). Die starke Expression im Cortex erklärt sich aus seiner Lokalisation im Verbindungsstück und im corticalen Sammelrohr, die in der Medulla durch die Expression im medullären Sammelrohr.

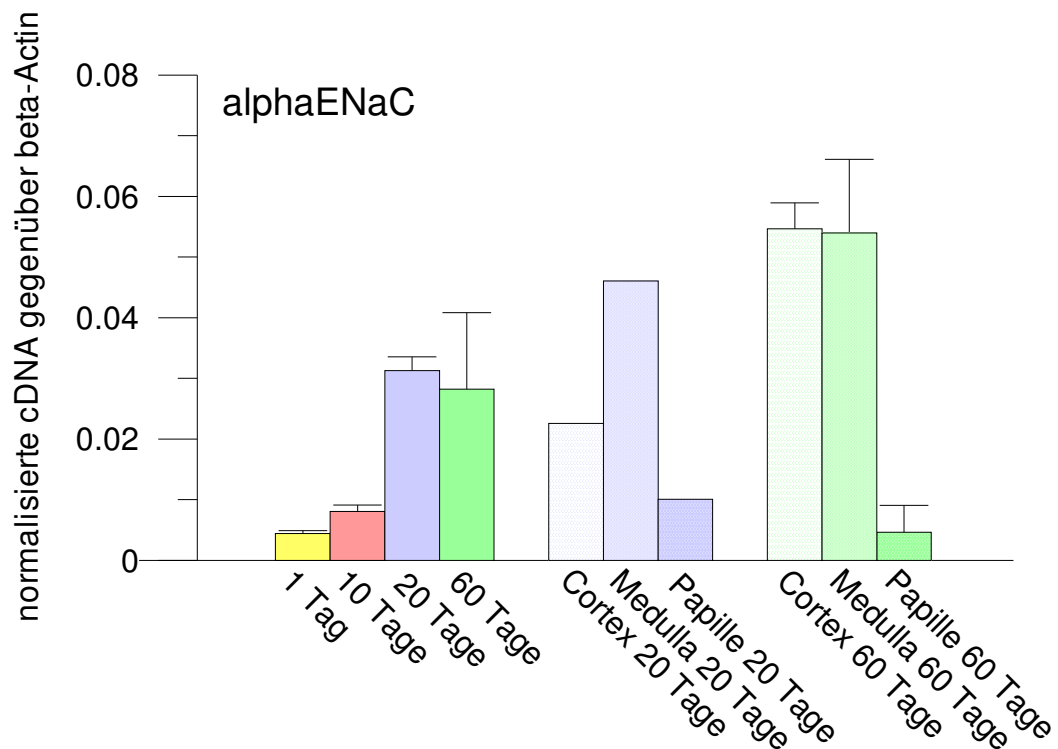


Abb. 26: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von α ENaC.

4.1.2 Kaliumkanäle, deren Expression im Verlauf der Entwicklung stabil bleibt

Für einige der untersuchten Kanalproteine (KCNAB1 und KCNK2) konnte keine eindeutige Veränderung des Expressionsmusters mit der Entwicklung festgestellt werden.

KCNAB1

KCNAB1, eine beta-Untereinheit des KCNMA1-Kaliumkanals (Abb. 18), zeigte keine eindeutige Altersabhängigkeit der Expression (Abb. 27). Der Kanal war besonders in Cortex und Medulla der 20 Tage und 60 Tage alten Tiere zu finden.

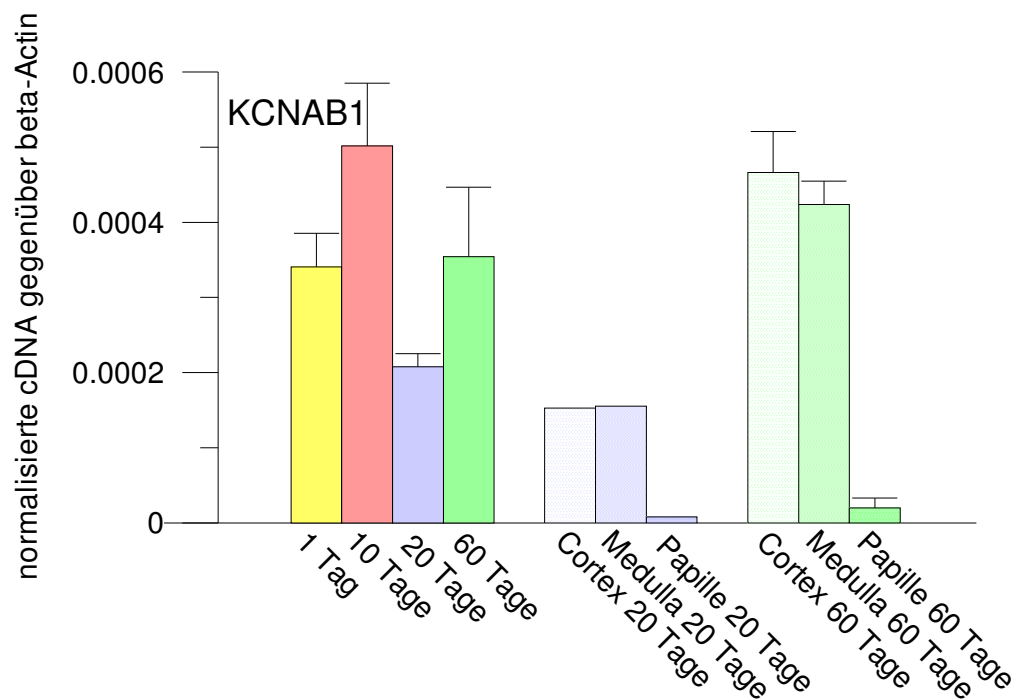


Abb. 27: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNAB1.

KCNK2 (TREK1)

Für KCNK2 zeigte sich bei insgesamt geringer Expression eine sehr spezifische Anreicherung in der Papille (Abb. 28), wie sie in dieser Form bei keinem anderen Kanal beobachtet wurde.

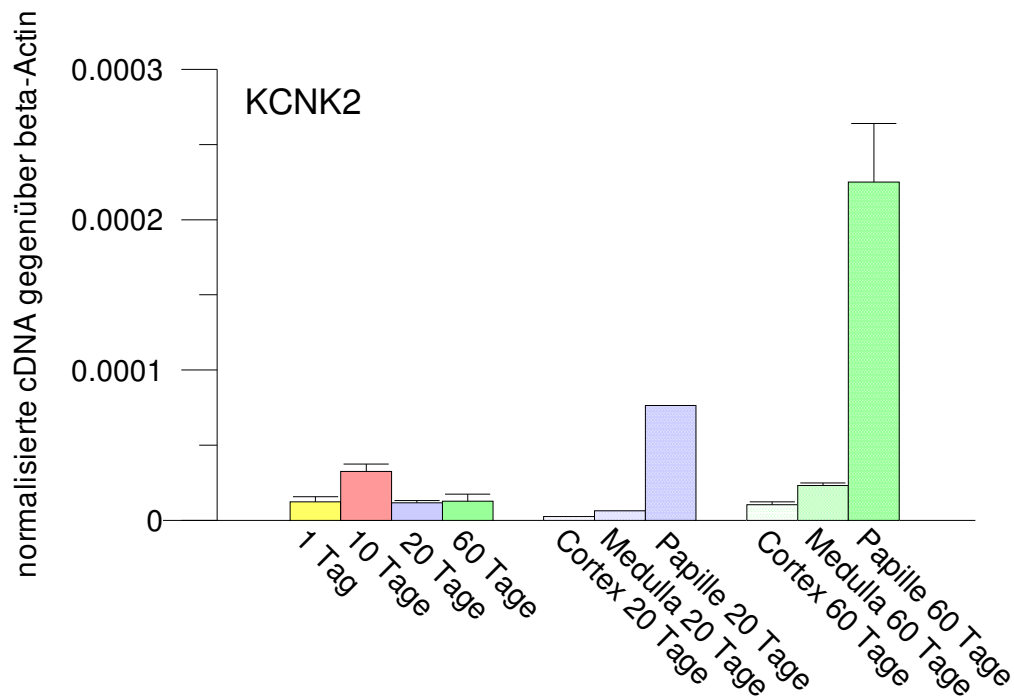


Abb. 28: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNK2.

4.1.3 Kaliumkanäle, deren Expression im Verlauf der Entwicklung abnimmt

Bei den folgenden Kanälen beobachtete ich eine Abnahme der Expressionsstärke mit dem Alter der Tiere: KCND1, KCND2, KCNE5, KCNH2, KCNJ8, KCNMB2, KCNMB4, KCNN4, KCNQ5 und KCNS3 (Abb. 29-37). Es ist zu vermuten, dass diese Kanäle eher mit Zellproliferation zu tun haben als mit spezifischen Funktionen im Rahmen des tubulären Transports.

KCND1 (Kv4.1)

KCND1 zeigt einen deutlichen Sprung beim Übergang vom 10. zum 20. Lebenstag (Abb. 29). Danach bleibt die Expression stabil. Mit 20 Tagen scheint ein größerer Anteil im Bereich der Papille zu liegen, was sich mit zunehmendem Alter aber auszugleichen scheint.

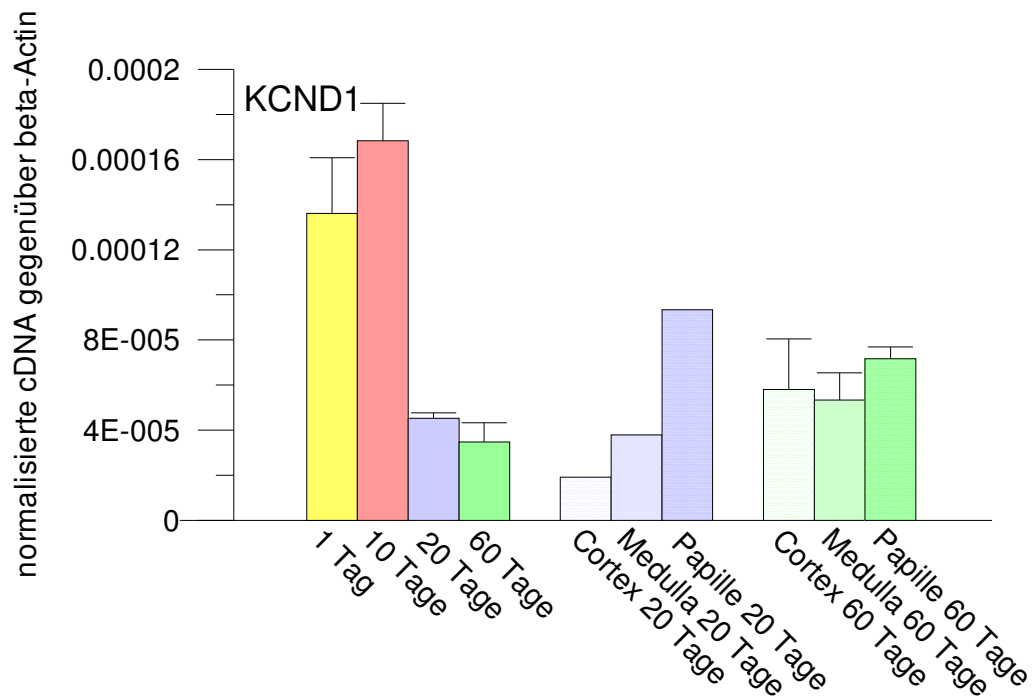


Abb. 29: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCND1.

KCND2 (Kv4.2)

KCND2 wies einen sehr deutlichen Peak der Expression im Alter von 10 Tagen und im Anschluss daran einen Abfall auf (Abb. 30), ähnlich dem von KCND1 (Abb. 29). Bei der adulten Maus ist KCND2 besonders in der Papille exprimiert.

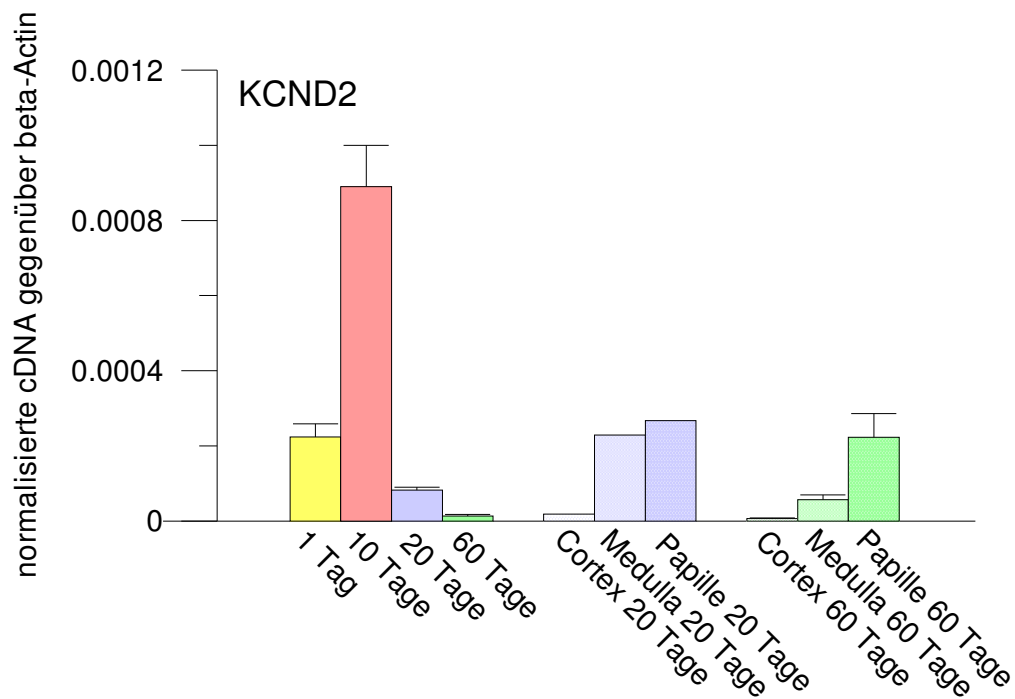


Abb. 30: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCND2.

KCNE5

Wie die beiden zuletzt genannten Kanalproteine zeigt auch KCNE5, eine beta-Untereinheit des KCNQ1 (Abb. 19 und 20), ein Maximum der Expression im Alter von 10 Tagen (Abb. 31). Die Expression ist innerhalb der Niere in der Papille am geringsten.

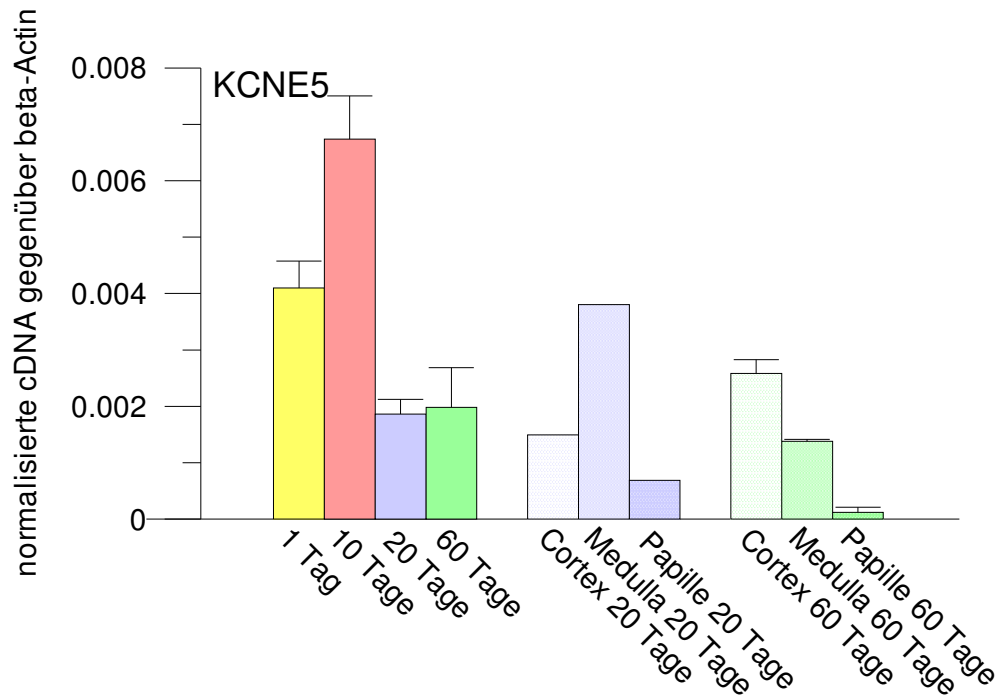


Abb. 31: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNE5.

KCNH2 (Erg1)

Das Expressionsprofil und die Expressionsstärke von KCNH2 (Abb. 32) ähnelte sehr denen von KCNE5 (Abb. 31).

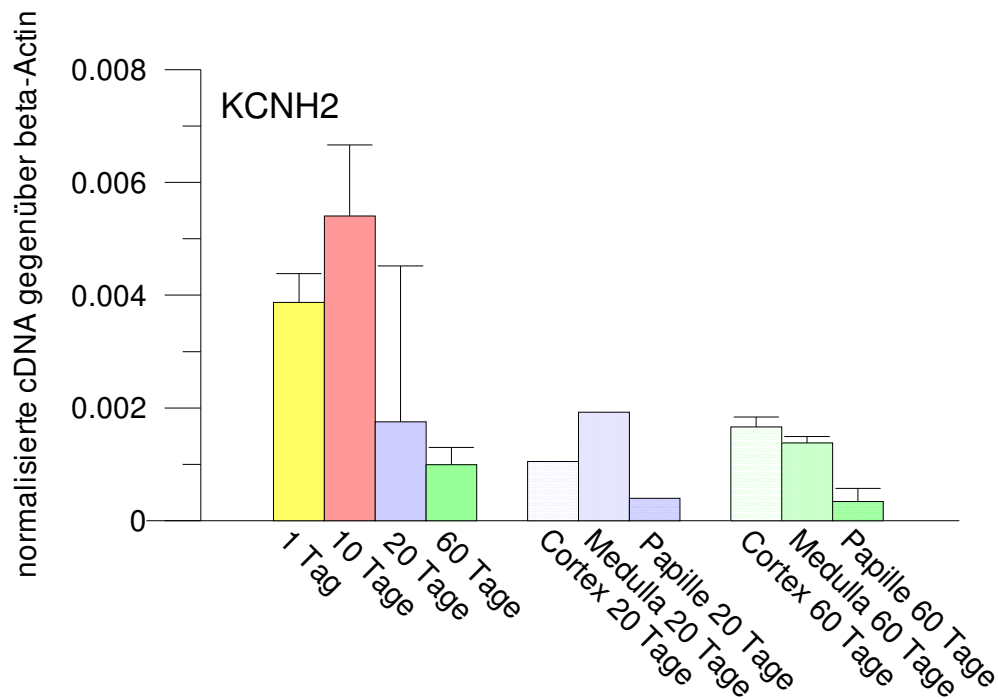


Abb. 32: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNH2.

KCNJ8 (Kir6.1)

Bei dem Einwärtsgleichrichter KCNJ8 beobachtete ich einen nur gering ausgeprägten altersabhängigen Abfall der Expression (Abb. 33). Die Expression innerhalb der Niere ließ kein klares Muster erkennen und die Expressionsstärke war nicht sehr hoch.

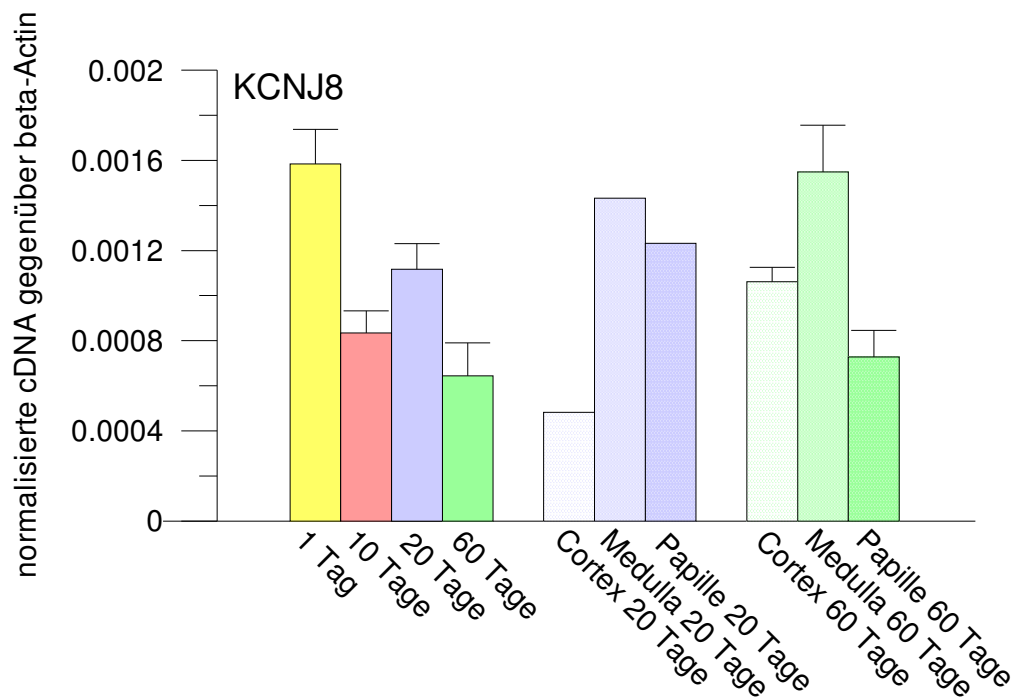


Abb. 33: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNJ8.

KCNMB2

Die Expression von KCNMB2 (Abb. 34), einer beta-Untereinheit von KCNMA1 (Abb. 18), zeigte ein Maximum bei den 1 Tag alten Tieren. Bei den 20 Tage alten Tieren ist KCNMB2 noch besonders in der Papille zu finden, bei den 60 Tage alten ist die Expression im Cortex die höchste (Abb. 34).

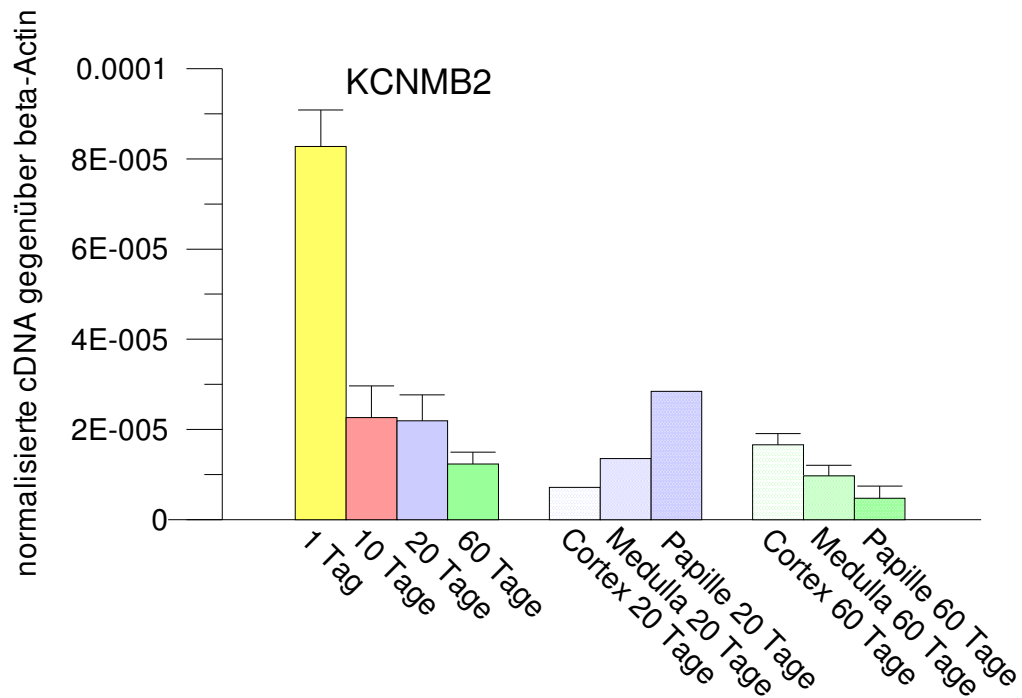


Abb. 34: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNMB2.

KCNMB4

Auch KCNMB4 zeigte, wie schon KCNMB2 (Abb. 34), eine sehr hohe Expression bei den 1 Tag alten Mäusen. Später ist die Expression niedriger und vor allem auf die Papille konzentriert (Abb. 35).

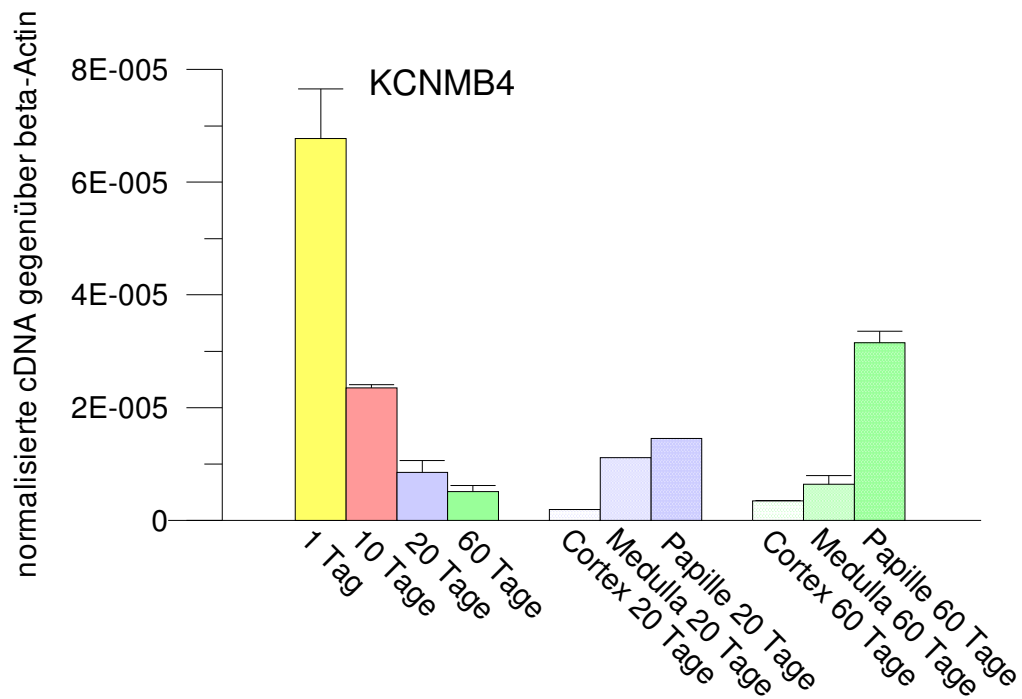


Abb. 34: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNNB4.

KCNN4 (IK1, SK4)

Auch der Ca^{2+} -aktivierte Kanal KCNN4 war besonders stark bei den neonatalen Mäusen zu finden. Bei der adulten Maus war die Expression in der Papille am geringsten (Abb. 35).

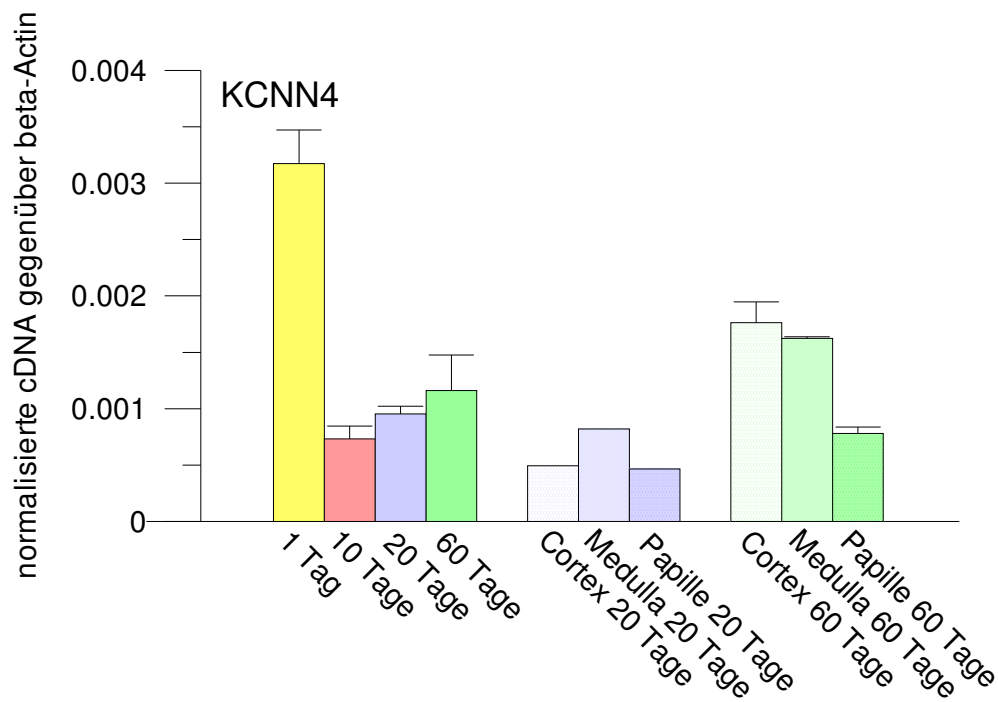


Abb. 35: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNN4.

KCNQ5

Der relativ schwach exprimierte KCNQ5 war vor allem im Bereich der Papille lokalisiert. Am ausgeprägtesten war dieses Expressionsmuster bei der 20 Tage alten Maus zu finden (Abb. 36). Insgesamt nimmt die Expression mit dem Älterwerden ab.

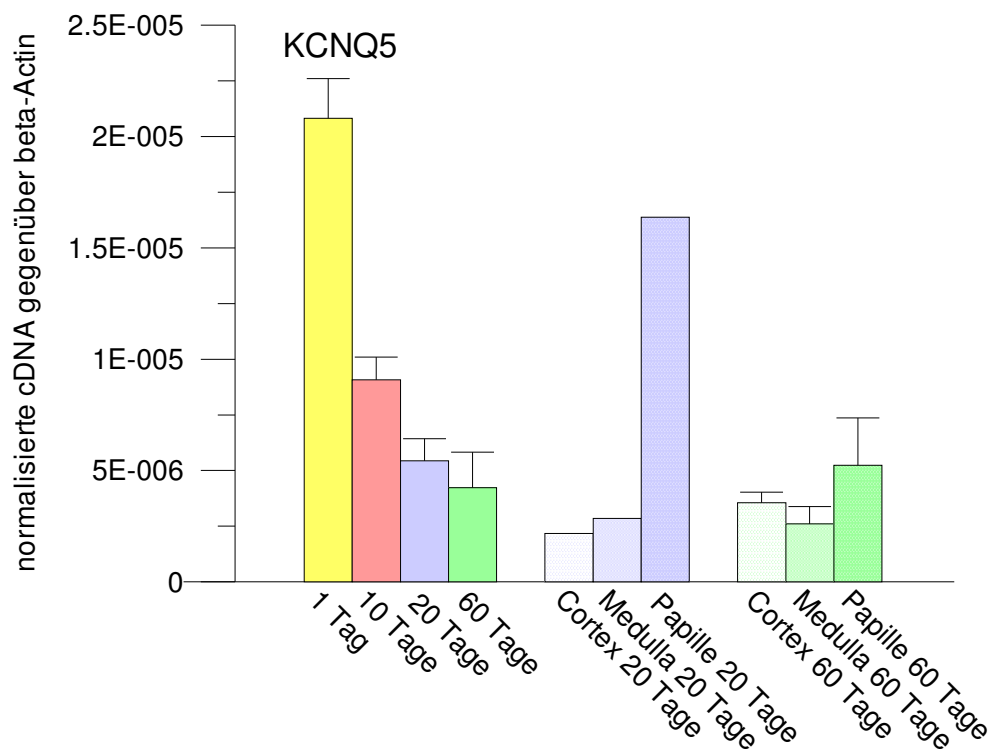


Abb. 36: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNQ5.

KCNS3

Für KCNS3 wurde ebenfalls ein wenn auch geringer Abfall zwischen 1. und 10. Lebenstag festgestellt (Abb. 37). Dabei überwiegt die Expression in Papille und Medulla.

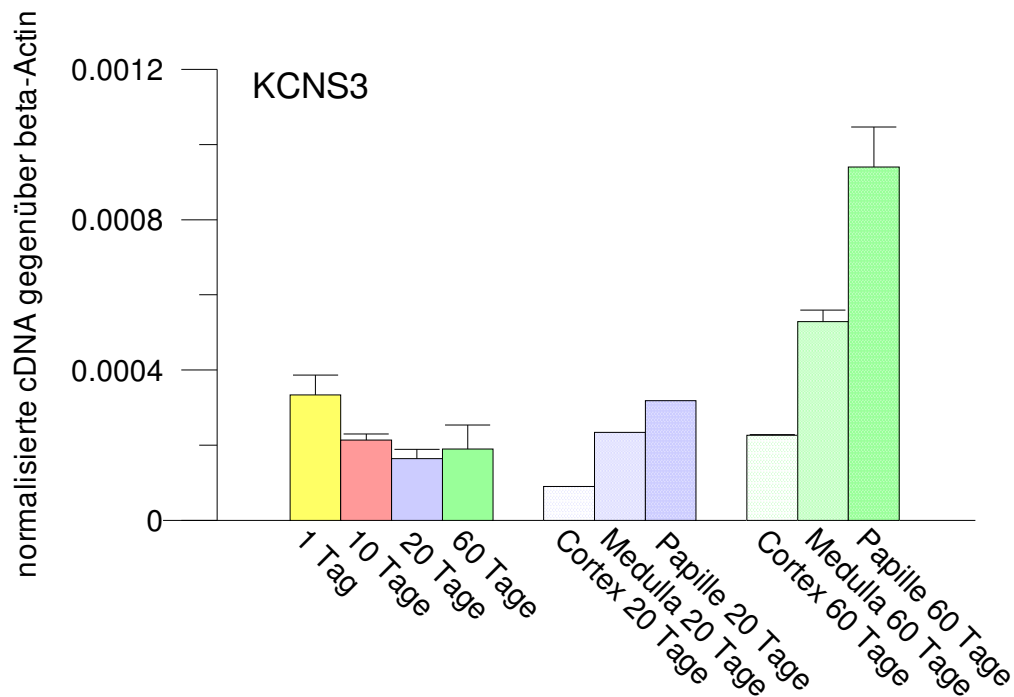


Abb. 37: Bestimmung der mRNA-Expression (bzw. cDNA) von KCNS3.

5. DISKUSSION

Die Niere ist während ihrer Entwicklung dramatischen Veränderungen unterworfen. Verschiedene Einflüsse wie die Umstellung von Muttermilch auf normale Nahrung oder das Wachstum spielen hierbei auch noch nach der Embryogenese eine bedeutende Rolle [32]. Untersuchungen haben zum Beispiel gezeigt, dass sich die Ausscheidungsfunktion in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium verändert [57;63]. So ändert sich die Salz- und Wasserausscheidung unmittelbar nach der Geburt sowie nach drei Wochen dramatisch. In der neonatalen Niere findet man zum Beispiel noch nicht ausgereifte dicke aufsteigende Henle-Schleifen, so dass ein großer Teil des glomerulär filtrierten Kaliums im distalen Tubulus ankommt [43], was sich mit zunehmendem Alter auf etwa 5-15% reduziert [26]. Nach dem Abstillen, also ab dem Alter von ca. 20 Tagen verändert sich die Nahrungszusammensetzung in der Form, dass der Proteinanteil erhöht ist [17], was wiederum eine erhöhte Anzahl an Harnstofftransportern erfordert [9].

Kaliumkanäle nehmen in der Niere eine Reihe von Funktionen wahr, sie sind beispielsweise notwendig für Zellproliferation, Differenzierung und

Volumenregulation. Vor allem aber sind sie in renalen Epithelzellen für das Funktionieren der Transportvorgänge notwendig, da sie direkt Kalium aus der Zelle befördern und außerdem durch die Etablierung eines hyperpolarisierten Membranpotentials elektrogene Transportprozesse antreiben. Beim Menschen sind 78 verschiedene porenbildende Untereinheiten von Kaliumkanälen bekannt. Unser Wissen über die Expression dieser Kanäle ist jedoch noch sehr lückenhaft und nur wenige Studien haben dies bisher untersucht [12].

Ziel meiner Untersuchungen war es herauszufinden, welche Kaliumkanäle in der Niere exprimiert werden und wie sich deren Verteilung im Zuge des Älterwerdens der Mäuse verändert. Hierbei konnten einige interessante Befunde erhoben werden, die in Tabelle 8 und 9 zusammengefasst wurden.

	1 Tag	10 Tage	20 Tage	60 Tage
KCNA3	+	+	+	+++
KCNAB1	++	+++	+	++
KCND1	+++	+++	+	+
KCND2	+	+++	+	+/-
KCNE1	+	+	++	+++
KCNE3	+	+	+	+++
KCNE5	++	+++	+	+
KCNH1	++	+	+	+++
KCNH2	++	++	+	+
KCNJ1	-	+	++	++
KCNJ3	+	++	++	+++
KCNJ8	+++	++	++	++
KCNJ15	+	+	++	+++
KCN J16	+	+	+	+++
KCNK1	+	+	++	++
KCNK2	+	++	+	+
KCNK5	+	+	++	+++
KCNMA1	+	++	+	+++
KCNMB2	+++	+	+	+
KCNMB4	+++	++	+	+
KCNN4	+++	++	++	++
KCNQ1	+	+	++	+++
KCNQ5	+++	++	+	+
KCNS3	++	+	+	+
SGLT1	+	+	++	+++
SGLT2	+	+	++	+++
NKCC2	+	+	++	++
α -ENaC	+	+	+++	+++

Tabelle 8: Expressionsstärke der untersuchten Kaliumkanäle und einiger segmentspezifischer Transporter in Abhängigkeit vom Alter der Mäuse.

Die meisten der untersuchten Kaliumkanäle und alle untersuchten segmentspezifischen Transporter zeigten eine mit dem Alter der Tiere zunehmende Expressionsstärke: KCNA3, KCNE1, KCNE3, KCNH1, KCNJ1, KCNJ3, KCNJ15, KCNJ16, KCNK1, KCNK5, KCNMA1, KCNQ1, SGLT1, SGLT2, NKCC2 und α -ENaC. Für die Kaliumkanäle dieser Gruppe ist es naheliegend anzunehmen, dass sie Funktionen wahrnehmen, die im Zusammenhang mit der Funktion differenzierter Nierenzellen stehen, d.h. im Wesentlichen assoziiert an tubulären Transport sind.

Bei 8 Kanälen war hingegen die Expression unmittelbar nach der Geburt am höchsten (KCND1, KCNH2, KCNJ8, KCNMB2, KCNMB4, KCNN4, KCNQ5, KCNS3) und bei weiteren 4 Kanälen war die Expression maximal im Alter von 10 Tagen (KCNAB1, KCND2, KCNE5, KCNK2). Bei diesen Kanälen, die sehr früh in der Niere hochreguliert sind, ist es naheliegend, dass sie mit Zellproliferation und mit Organwachstum zu tun haben. Es ist in dieser Hinsicht nicht verwunderlich, dass einige der Kanäle (z.B. KCND1 und KCND2) besonders in Zellen und Geweben gefunden werden, die hohe Proliferationsraten zeigen, z.B. embryonale Zellen oder Tumorzellen [34;35;38]. Die Kenntnis der Assoziation der Kanalexpression an die Transportfunktion oder Proliferation/Wachstum kann dazu beitragen, die Eigenschaften von kultivierten Nierenzellen einzuschätzen und zu beurteilen, wie geeignet oder ungeeignet Zellmodelle für das Studium von Transportprozessen sind.

	Cortex	Medulla	Papille
KCNA3	+++	++	+
KCNAB1	+++	++	+
KCND1	++	++	++
KCND2	+/-	+	++
KCNE1	+++	++	+
KCNE3	+++	+	+
KCNE5	+++	++	+
KCNH1	+++	++(+)	+
KCNH2	++(+)	++	+
KCNJ1	++	+++	++
KCNJ3	+++	++	+
KCNJ8	++	+++	++
KCNJ15	+++	++	+/-

KCN J16	+++	++	+
KCNK1	++	+++	++
KCNK2	+	+	+++
KCNK5	+++	++	++
KCNMA1	++	+++	+
KCNMB2	+	+	+
KCNMB4	+	+	++
KCNN4	++(+)	++	+
KCNQ1	++	+++	++
KCNQ5	+	+	++
KCNS3	+	++	+++
SGLT1	++	+++	+
SGLT2	+++	+	-
NKCC2	+	+++	+
α -ENaC	+++	+++	+

Tabelle 9: Expressionsstärke in Abhängigkeit von der Lokalisation

Die unterschiedliche Expression der Kanäle in Cortex, Medulla und Papille lässt sich durch die Segment-spezifische Lokalisation erklären. Im Cortex finden sich überwiegend proximale Tubuli und die corticalen Abschnitte der Sammelrohre. In der Medulla überwiegen die intermediären Tubuli sowie die dicken aufsteigenden Teile der Henle-Schleifen. Die Papille besteht überwiegend aus den papillären Sammelrohren und den dünnen Anteilen der Henle-Schleifen. Über den Expressionsort können deshalb indirekt auch Vermutungen bezüglich der Funktion der Kanäle angestellt werden.

Bezüglich des Verteilungsmusters innerhalb der Niere konnte festgestellt werden, dass eine Reihe der Kaliumkanäle am stärksten im Bereich des Nierencortex exprimiert ist: KCNA3, KCNAB1, KCNE1, KCNE3, KCNE5, KCNH1, KCNH2, KCNJ3, KCNJ15, KCNJ16, KCNK5 und KCNN4. Dies spricht dafür, dass die Kanäle entweder glomerulär, in frühen proximalen Tubuli, im distalen Convolut, im Verbindungsstück oder im corticalen Sammelrohr lokalisiert sind. Bei ausschließlicher Lokalisation in den Glomeruli ist jedoch nur mit einem sehr niedrigen Signal zu rechnen, da die Glomeruli an der Zellmasse des Cortex nur geringen Anteil haben.

Im Bereich der Medulla sind 5 der Kanäle besonders stark exprimiert: KCNJ1, KCNJ8, KCNK1, KCNMA1 und KCNQ1. Dort findet sich auch das stärkste Signal

für den SGLT1 (Glucosetransporter des späten proximalen Tubulus im äußeren Medulla) und für NKCC2 ($\text{Na}^+2\text{Cl}^-\text{K}^+$ -Kotransporter in der dicken aufsteigenden Henleschleife).

In der Papille sind 5 der untersuchten Kanäle am stärksten exprimiert: KCND2, KCNK2, KCNMB4, KCNQ5 und KCNS3. Besonders ausgeprägt war die spezifische Expression in der Papille bei dem mechano-sensitiven KCNK2 (TREK1). Es ist denkbar, dass der Kanal für die Konstanthaltung des Zellvolumens bei unterschiedlichen Urinosmolaritäten eine Rolle spielt. Er wird außerdem durch Arachidonsäurederivate aktiviert [19]. Möglicherweise trägt seine Beeinträchtigung zur Entstehung der Papillenschädigung durch nichtsteroidale Antiphlogistika bei, wenn letztere den Arachidonsäuremetabolismus verändern.

Die hier erhobenen Expressionsdaten bilden die Basis für weitergehende Untersuchungen unseres Labors. Bei Interesse für ein bestimmtes Nephronsegment kann nun leichter abgeschätzt werden, mit welchen Kandidaten unter der Vielzahl von Kaliumkanälen zu rechnen ist.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im menschlichen Genom fand man 78 verschiedene Gene, welche für porenbildende Untereinheiten von Kaliumkanälen kodieren. Die unterschiedlichen Gewebe des Körpers weisen jeweils eine spezifische Ausstattung an Kaliumkanälen auf, welche an die Funktion der organtypischen Zellen angepasst ist. In der Niere spielen Kaliumkanäle eine wichtige Rolle bei Transportvorgängen, indem sie das Membranpotential hyperpolarisiert halten und als direkter Sekretionsweg für Kalium dienen. Darüber hinaus weiß man, dass grundlegende zellbiologische Vorgänge wie Zellproliferation und Wachstum ebenfalls an die Funktion bestimmter Kaliumkanäle gebunden sind. Allerdings ist über die molekulare Identität der renalen Kaliumkanäle und ihre Expression während der Entwicklung der Niere relativ wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression von Kaliumkanälen in der Niere mittels Realtime-PCR zu untersuchen. Des Weiteren habe ich untersucht, wie sich die Expression altersabhängig ändert und ob die Kanäle bevorzugt im Cortex, der Medulla oder der Papille der Niere exprimiert werden.

Ausgehend von einer EST-basierten Vorauswahl habe ich die Expression von 24 verschiedenen Kaliumkanälen zu vier Zeitpunkten untersucht. Die Kanäle lassen sich basierend auf der Altersabhängigkeit der Expression in zwei Gruppen einteilen:

1. Kanäle, die vermutlich Transport-assoziierte Funktionen wahrnehmen

Die Expression von 12 der untersuchten Kanäle nahm - wie die von bekannten Transportproteinen - abhängig von der Nierenreifung mit dem Alter der Tiere zu.

2. Kanäle, deren Expression vermutlich Zellproliferation-assoziiert ist

Die Expression 12 weiterer Kanäle war in der adulten Niere geringer als bei sehr jungen Tieren. Die Expression dieser Kanäle könnte auch bei der Entdifferenzierung von Zellen und bei der Tumorentstehung erhöht sein.

In einem zweiten Schritt habe ich untersucht, wie stark die Kanäle in Cortex, Medulla und Papille exprimiert sind. Die erhobenen Daten geben somit eine Übersicht über das Expressionsprofil der einzelnen Kanäle und lassen in gewissem Umfang funktionelle Rückschlüsse zu. Sie können außerdem dazu dienen, den Differenzierungsgrad von kultivierten Nierenzellen einzuschätzen und stellen eine Basis für weiterführende Studien zu renalen Kaliumkanälen dar.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Atlas of Diseases of the Kidney. 1995.

Ref Type: Internet Communication

2. Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noel J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M: TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* 2006;25:2368-2376.
3. Balen D, Ljubojevic M, Breljak D, Brzica H, Zlender V, Koepsell H, Sabolic I: Revised immunolocalization of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:C475-C489.
4. Bao L, Kaldany C, Holmstrand EC, Cox DH: Mapping the BKCa channel's "Ca²⁺ bowl": side-chains essential for Ca²⁺ sensing. *J Gen Physiol* 2004;123:475-489.
5. Bapty BW, Dai LJ, Ritchie G, Canaff L, Hendy GN, Quamme GA: Mg²⁺/Ca²⁺ sensing inhibits hormone-stimulated Mg²⁺ uptake in mouse distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol* 1998;275:F353-F360.
6. Benziene B, Demaretz S, Defontaine N, Zaarour N, Cheval L, Bourgeois S, Klein C, Froissart M, Blanchard A, Paillard M, Gamba G, Houillier P, Laghmani K: NKCC2 surface expression in mammalian cells: down-regulation by novel interaction with aldolase B. *J Biol Chem* 2007;282:33817-33830.
7. Bleich M, Heitzmann D, Hug MJ, Hoffmann EK, Greger R, Warth R: Regulation of the Na⁺ 2Cl⁻ K⁺ co-transporter--mechanisms in the rectal gland of *Squalus acanthias* with implications for the thick ascending limb of Henle. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15 Suppl 6:16-18.
8. Bockenhauer D, Feather S, Stanescu HC, Bandulik S, Zdebik AA, Reichold M, Tobin J, Lieberer E, Sterner C, Landouze G, Arora R, Sirimanna T, Thompson D, Cross JH, van't Hoff W, Al Masri O, Tullus K, Yeung S, Anikster Y, Klotwijk E, Hubank M, Dillon MJ, Heitzmann D, Arcos-Burgos M, Knepper MA, Dobbie A, Gahl WA, Warth R, Sheridan E, Kleta R: Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N Engl J Med* 2009;360:1960-1970.
9. Bonilla-Felix M: Development of water transport in the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F1093-F1101.
10. Buckler KJ, Williams BA, Honore E: An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol* 2000;525 Pt 1:135-142.

11. Carattino MD, Passero CJ, Steren CA, Maarouf AB, Pilewski JM, Myerburg MM, Hughey RP, Kleyman TR: Defining an inhibitory domain in the alpha-subunit of the epithelial sodium channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F47-F52.
12. Chabardes-Garonne D, Mejean A, Aude JC, Cheval L, Di Stefano A, Gaillard MC, Imbert-Teboul M, Wittner M, Balian C, Anthouard V, Robert C, Segurens B, Wincker P, Weissenbach J, Doucet A, Elalouf JM: A panoramic view of gene expression in the human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:13710-13715.
13. Chandy KG: Simplified gene nomenclature. *Nature* 1991;352:26.
14. Costanzo LS: Comparison of calcium and sodium transport in early and late rat distal tubules: effect of amiloride. *Am J Physiol* 1984;246:F937-F945.
15. Dai LJ, Ritchie G, Kerstan D, Kang HS, Cole DE, Quamme GA: Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule. *Physiol Rev* 2001;81:51-84.
16. Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R: The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 1998;280:69-77.
17. EPSTEIN FH, Kleeman CR, PURSEL S, HENDRIKX A: The effect of feeding protein and urea on the renal concentrating process. *J Clin Invest* 1957;36:635-641.
18. Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, Aiyar J: Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J Biol Chem* 1999;274:5746-5754.
19. Fink M, Lesage F, Duprat F, Heurteaux C, Reyes R, Fosset M, Lazdunski M: A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 1998;17:3297-3308.
20. Giebisch G: Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am J Physiol* 1998;274:F817-F833.
21. Giebisch G, Wang W: Potassium transport: from clearance to channels and pumps. *Kidney Int* 1996;49:1624-1631.
22. Giebisch G, Wang W: Renal tubule potassium channels: function, regulation and structure. *Acta Physiol Scand* 2000;170:153-173.
23. Giebisch GH: A trail of research on potassium. *Kidney Int* 2002;62:1498-1512.
24. Greger R: Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 1985;65:760-797.

25. Gruss M, Bushell TJ, Bright DP, Lieb WR, Mathie A, Franks NP: Two-pore-domain K⁺ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol Pharmacol* 2004;65:443-452.
26. Gurkan S, Estilo GK, Wei Y, Satlin LM: Potassium transport in the maturing kidney. *Pediatr Nephrol* 2007;22:915-925.
27. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X: International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;57:473-508.
28. Hebert SC, Andreoli TE: Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *Am J Physiol* 1984;246:F745-F756.
29. Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W: Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev* 2005;85:319-371.
30. Heitzmann D, Warth R: Physiology and pathophysiology of potassium channels in gastrointestinal epithelia. *Physiol Rev* 2008;88:1119-1182.
31. Hierholzer K. FN: Funktionen der Nieren; in Schmidt R.F. TG (ed): *Physiologie des Menschen*. Springer, 1995.
32. Horster M, Huber S, Tschop J, Dittrich G, Braun G: Epithelial nephrogenesis. *Pflugers Arch* 1997;434:647-660.
33. International Union of Pharmacology: Potassium channels. *International Union of Pharmacology* 2002;59-63.
34. Isbrandt D, Leicher T, Waldschutz R, Zhu X, Luhmann U, Michel U, Sauter K, Pongs O: Gene structures and expression profiles of three human KCND (Kv4) potassium channels mediating A-type currents I(TO) and I(SA). *Genomics* 2000;64:144-154.
35. Jang SH, Choi C, Hong SG, Yarishkin OV, Bae YM, Kim JG, O'Grady SM, Yoon KA, Kang KS, Ryu PD, Lee SY: Silencing of Kv4.1 potassium channels inhibits cell proliferation of tumorigenic human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;384:180-186.
36. Jenkinson DH: Potassium channels--multiplicity and challenges. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S63-S71.
37. Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SA: A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 1995;376:690-695.
38. Kim HJ, Jang SH, Jeong YA, Ryu PD, Kim DY, Lee SY: Involvement of Kv4.1 K(+) channels in gastric cancer cell proliferation. *Biol Pharm Bull* 2010;33:1754-1757.

39. Koeppen B, Giebisch G: Cellular electrophysiology of potassium transport in the mammalian cortical collecting tubule. *Pflugers Arch* 1985;405 Suppl 1:S143-S146.
40. Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA: International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;57:509-526.
41. Lafreniere RG, Cader MZ, Poulin JF, Andres-Enguix I, Simoneau M, Gupta N, Boisvert K, Lafreniere F, McLaughlan S, Dube MP, Marcinkiewicz MM, Ramagopalan S, Ansorge O, Brais B, Sequeiros J, Pereira-Monteiro JM, Griffiths LR, Tucker SJ, Ebers G, Rouleau GA: A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med* 2010;16:1157-1160.
42. Lee YM, Kim BJ, Chun YS, So I, Choi H, Kim MS, Park JW: NOX4 as an oxygen sensor to regulate TASK-1 activity. *Cell Signal* 2006;18:499-507.
43. Lelievre-Pegorier M, Merlet-Benichou C, Roinel N, de Rouffignac C: Developmental pattern of water and electrolyte transport in rat superficial nephrons. *Am J Physiol* 1983;245:F15-F21.
44. Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J: TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J* 1996;15:1004-1011.
45. Lesage F, Lauritzen I, Duprat F, Reyes R, Fink M, Heurteaux C, Lazdunski M: The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K⁺ channel. *FEBS Lett* 1997;402:28-32.
46. Lesage F, Lazdunski M: Potassium channels with two P domains. *Curr Top Membr Transp* 1999;46:199-222.
47. Lu M, Giebisch G, Wang W: Nitric oxide links the apical Na⁺ transport to the basolateral K⁺ conductance in the rat cortical collecting duct. *J Gen Physiol* 1997;110:717-726.
48. Lu M, Giebisch G, Wang W: Nitric oxide-induced hyperpolarization stimulates low-conductance Na⁺ channel of rat CCD. *Am J Physiol* 1997;272:F498-F504.
49. MacKinnon R: Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991;350:232-235.
50. Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, Koseki H, Iwanaga T, Nakaya H, Seino S: Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med* 2002;8:466-472.
51. Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z: Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 2002;32:1372-1379.

52. Noulin JF, Brochiero E, Lapointe JY, Laprade R: Two types of K(+) channels at the basolateral membrane of proximal tubule: inhibitory effect of taurine. *Am J Physiol* 1999;277:F290-F297.
53. O'Neil RG, Helman SI: Transport characteristics of renal collecting tubules: influences of DOCA and diet. *Am J Physiol* 1977;233:F544-F558.
54. Patel AJ, Lazdunski M: The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers Arch* 2004;448:261-273.
55. Preston P, Wartosch L, Gunzel D, Fromm M, Kongsuphol P, Ousingsawat J, Kunzelmann K, Barhanin J, Warth R, Jentsch TJ: Disruption of the K⁺ channel beta-subunit KCNE3 reveals an important role in intestinal and tracheal Cl⁻ transport. *J Biol Chem* 2010;285:7165-7175.
56. Pschyrembel W: Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, ed 259. Auflage, Berlin, New York, Walter de Gruyter, 2002.
57. Rane S, Aperia A, Eneroth P, Lundin S: Development of urinary concentrating capacity in weaning rats. *Pediatr Res* 1985;19:472-475.
58. Robbins J: KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther* 2001;90:1-19.
59. Salkoff L, Wyman R: Genetic modification of potassium channels in *Drosophila* Shaker mutants. *Nature* 1981;293:228-230.
60. Sansom SC, Agulian S, Muto S, Illig V, Giebisch G: K activity of CCD principal cells from normal and DOCA-treated rabbits. *Am J Physiol* 1989;256:F136-F142.
61. Scholl UI, Choi M, Liu T, Ramaekers VT, Hausler MG, Grimmer J, Tobe SW, Farhi A, Nelson-Williams C, Lifton RP: Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:5842-5847.
62. Schumacher MA, Rivard AF, Bachinger HP, Adelman JP: Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature* 2001;410:1120-1124.
63. Siga E, Horster MF: Regulation of osmotic water permeability during differentiation of inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 1991;260:F710-F716.
64. Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad SA, Lifton RP: Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. *Nat Genet* 1996;14:152-156.

65. Snyder PM, McDonald FJ, Stokes JB, Welsh MJ: Membrane topology of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 1994;269:24379-24383.
66. Vallon V, Grahmmer F, Richter K, Bleich M, Lang F, Barhanin J, Volkl H, Warth R: Role of KCNE1-dependent K⁺ fluxes in mouse proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2003-2011.
67. Vallon V, Grahmmer F, Volkl H, Sandu CD, Richter K, Rexhepaj R, Gerlach U, Rong Q, Pfeifer K, Lang F: KCNQ1-dependent transport in renal and gastrointestinal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17864-17869.
68. Wareing M, Wilson RW, Kibble JD, Green R: Estimated potassium reflection coefficient in perfused proximal convoluted tubules of the anaesthetized rat in vivo. *J Physiol* 1995;488 (Pt 1):153-161.
69. Warth R: Potassium channels in epithelial transport. *Pflugers Arch* 2003;446:505-513.
70. Warth R, Barriere H, Meneton P, Bloch M, Thomas J, Tauc M, Heitzmann D, Romeo E, Verrey F, Mengual R, Guy N, Bendahhou S, Lesage F, Poujeol P, Barhanin J: Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8215-8220.
71. Wei A, Solaro C, Lingle C, Salkoff L: Calcium sensitivity of BK-type K_{Ca} channels determined by a separable domain. *Neuron* 1994;13:671-681.
72. Weinstein AM: Modeling the proximal tubule: complications of the paracellular pathway. *Am J Physiol* 1988;254:F297-F305.
73. Welsch U: *Lehrbuch Histologie* 2003.
74. White JA, McAlpine PJ, Antonarakis S, Cann H, Eppig JT, Frazer K, Frezal J, Lancet D, Nahmias J, Pearson P, Peters J, Scott A, Scott H, Spurr N, Talbot C, Jr., Povey S: Guidelines for human gene nomenclature (1997). HUGO Nomenclature Committee. *Genomics* 1997;45:468-471.
75. Woda CB, Bragin A, Kleyman TR, Satlin LM: Flow-dependent K⁺ secretion in the cortical collecting duct is mediated by a maxi-K channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F786-F793.
76. Wright EM: Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F10-F18.
77. Xu JC, Lytle C, Zhu TT, Payne JA, Benz E Jr, Forbush B, III: Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2201-2205.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät III an der Universität Regensburg, unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Richard Warth angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Richard Warth für die Überlassung des Themas, die herausragende Betreuung und kritische Diskussion dieser Dissertation, sowie für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Dr. Markus Reichold und Herrn Dr. Sascha Bandulik danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung der Immunfluoreszenzfärbungen, die fachliche Unterstützung und zahlreiche Ratschläge.

Auch Herrn PD. Dr. Dirk Heitzmann danke ich für die fachliche Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Christina Sterner und Frau Ines Tegtmeier für die freundliche und ständige Unterstützung im Labor bedanken.