

Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von KCNJ16

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN

(DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III

– BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN –

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von

Evelyn Humberg (geb. Lieberer)

aus Ingolstadt

im Jahr 2013

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Juni 2010 bis Juli 2013 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Richard Warth am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med. Richard Warth

Promotionsgesuch eingereicht am: 31.07.2013

Promotionskolloquium am: 24.10.2013

Prüfungsausschuss:
Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner (Vorsitzende)
Herr Prof. Dr. med. Richard Warth (1. Gutachter/Prüfer)
Herr Prof. Dr. med. Frank Schweda (2. Gutachter/Prüfer)
Herr Prof. Dr. Jens Schlossmann (3. Prüfer)

Unterschrift Doktorandin: _____

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Physiologie und Pathophysiologie des DCT	1
1.1.1 Rückresorptionsvorgänge im DCT	1
1.1.2 Erkrankungen des DCT.....	5
1.1.2.1 Das Gitelman-Syndrom	5
1.1.2.2 PHA II	6
1.1.2.3 Bartter-Syndrom Typ III.....	6
1.1.2.4 Das EAST-Syndrom	7
1.2 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle im DCT.....	9
1.2.1 Klassifizierung, Struktur und Regulation von Kaliumkanälen.....	9
1.2.2 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle	12
1.2.2.1 Membrantopologie, Eigenschaften und Funktionen	12
1.2.2.2 Einteilung und Regulation	13
1.2.2.3 KCNJ10.....	14
1.2.2.4 KCNJ16.....	17
2. Zielsetzung	20
3. Material und Methoden	21
3.1 Material	21
3.1.1 Zelllinien.....	21
3.1.2 Geräte	21
3.1.3 Verbrauchsmaterial	23
3.1.4 Chemikalien, Enzyme und Substanzen	24
3.1.5 Kits	26
3.1.6 Primer	27
3.1.7 PCR-Programme	27
3.1.8 Plasmide	28
3.1.9 Medien.....	29
3.1.10 Lösungen und Mastermix-Ansätze	30
3.1.11 Antikörper.....	32
3.1.12 Software	33
3.2 Methoden.....	34
3.2.1 Versuchstiere	34
3.2.2 Zellkultur-Arbeiten	34

3.2.2.1	Splitten von Zellen.....	34
3.2.2.2	Transfektion von HEK-Zellen mit Lipofectamine.....	35
3.2.2.3	Elektroporation von CHO-Zellen	35
3.2.2.4	Cotransfektion mit KCNJ10 und KCNJ16	36
3.2.3	Histologische Methoden	36
3.2.3.1	Retrograde arterielle Perfusion von Mäusen.....	36
3.2.3.2	Vorbereitung und Anfertigung von Gewebeschnitten	37
3.2.3.3	Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten	37
3.2.3.4	Immunhistochemische Färbung von transfizierten Zellen	38
3.2.4	Molekularbiologische Methoden	38
3.2.4.1	Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	38
3.2.4.2	Isolierung von Total-RNA aus Organen	39
3.2.4.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	39
3.2.4.4	Qualitative und quantitative PCR.....	40
3.2.4.5	Transformation von kompetenten XL1-Blue Zellen.....	41
3.2.4.6	Mini- und Midi-Präparation (Plasmidisolierung)	41
3.2.4.7	Site-directed Mutagenesis	41
3.2.5	Analyse von Blut- und Urinproben	42
3.2.5.1	Probengewinnung	42
3.2.5.2	Aldosteron-ELISA.....	42
3.2.5.3	Ionenchromatographie	43
3.2.5.4	Blutgasanalyse und Elektrolytmessungen	43
3.2.6	Nicht-invasive Blutdruckmessungen am wachen Tier	43
3.2.7	GFR-Messungen und Diuretika-Versuche	44
3.2.8	Patch-Clamp Experimente	46
3.2.8.1	Vorbereitung der Zellen für Patch-Clamp Experimente	48
3.2.8.2	Whole cell Experimente	48
3.2.8.3	Single channel Experimente.....	50
3.2.9	Statistik	51
4.	Ergebnisse	52
4.1	Expression von KCNJ16.....	52
4.1.1	Gewebeverteilung von KCNJ16	52
4.1.2	Lokalisation von KCNJ16 in der Niere.....	53
4.2	<i>In vivo</i> Experimente	56
4.2.1	Wachstum und Entwicklung von KCNJ16 Mäusen	56
4.2.2	Auswirkungen des KCNJ16 Knockouts auf den Elektrolythaushalt	57

4.2.2.1	Elektrolytmessungen im Plasma	57
4.2.2.2	Elektrolytmessungen im Urin vier Tage alter Mäuse	60
4.2.2.3	Altersabhängige Elektrolytausscheidung	61
4.2.2.4	Elektrolytmessungen im Urin adulter Mäuse	64
4.2.2.5	Elektrolyt- und Wasserausscheidung unter Einfluss von Amilorid und HCT	66
4.2.2.6	Blutgase und Säure-Basen-Haushalt	69
4.2.2.7	Aldosteronmessungen	70
4.2.3	Blutdruckmessungen	71
4.2.4	Messung der glomerulären Filtrationsrate	73
4.2.5	Elektrophysiologische Experimente	74
4.2.5.1	Whole cell Messungen	74
4.2.5.2	Single channel Messungen	76
4.2.6	Immunfluoreszenzfärbungen von transfizierten CHO-Zellen	80
5.	Diskussion	83
5.1	Expression von KCNJ16	83
5.2	Phänotyp der KCNJ16 Knockoutmaus	84
5.3	Auswirkungen der KCNJ16 Mutation R137C	89
5.4	Vergleich der Ergebnisse mit der klinischen Symptomatik beim Menschen	91
5.5	Ausblick	94
6.	Zusammenfassung	95
	LITERATURVERZEICHNIS	97
	PUBLIKATIONEN	107
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	109
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	111
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	113
	DANKSAGUNG	114

1. Einleitung

1.1 Physiologie und Pathophysiologie des DCT

1.1.1 Rückresorptionsvorgänge im DCT

Zu den Hauptaufgaben der Nieren gehört die Rückresorption von Wasser, Elektrolyten und zahlreichen anderen Stoffen aus dem Primärharn. Außerdem sind sie für die Produktion wichtiger Hormone und die Ausscheidung wasserlöslicher Stoffwechselendprodukte, überschüssiger Elektrolyte und Xenobiotika zuständig. Die Rückresorptionsprozesse im renalen Tubulussystem dienen der Wasser- und Elektrolythomöostase, der Blutdruckregulation und der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes. Damit sind die Nieren wesentlich an der Aufrechterhaltung zahlreicher Körperfunktionen beteiligt.

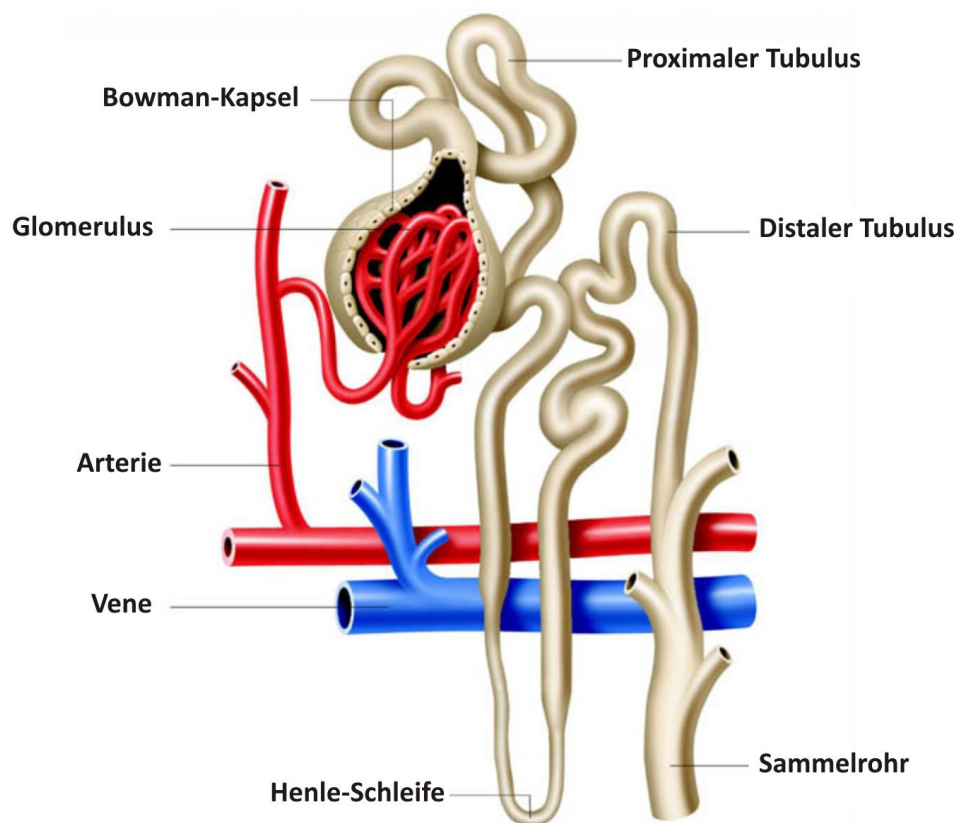


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Nephrons

Am Glomerulus wird das Plasma filtriert und der Primärharn gebildet. Dieser wird in der Bowman-Kapsel gesammelt und gelangt von dort aus in das Tubulussystem, in dem zahlreiche Sekretions- und Rückresorptionsprozesse stattfinden. In dieser Abbildung ist die grobe Untergliederung des Tubulussystems in proximalen Tubulus, Henle-Schleife, distalen Tubulus und Sammelrohr dargestellt. (modifizierte Abbildung von <http://www.jameda.de/gesundheits-lexikon/nephron/>)

Die Glomeruli der Nieren produzieren täglich rund 180 Liter Plasmaultrafiltrat, den sogenannten Primärharn. Von dieser großen Menge an Filtrat wird am Ende nur ein kleiner Teil über den Urin ausgeschieden (1,5 bis 2 Liter pro Tag). Um die Wasser- und Elektrolythomöostase im Körper zu erhalten, müssen die meisten filtrierte Substanzen entlang des Tubulussystems wieder rückresorbiert werden [1]. Der größte Anteil der filtierten Stoffe wird dabei bereits im proximalen Tubulus (vgl. Abbildung 1) zurückgewonnen. Rund 65 % aller Ionen werden dort aus dem Primärharn in den Blutstrom transportiert. Etwa 25 % der filtierten Salze werden in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (TAL) rückresorbiert und die restlichen rund 10 % im distalen Tubulus und Sammelrohr. Vereinfacht kann man daher sagen, dass im proximalen Tubulus „Massentransport“ von Wasser, zahlreichen Ionen und weiteren Substanzen (z. B. Glucose, Aminosäuren etc.) stattfindet, während im distalen Nephron die Feinabstimmung der finalen Urinzusammensetzung vorgenommen wird. Das distale Nephron ist daher der Angriffspunkt für zahlreiche Hormone, die die Endkonzentration des Urins bestimmen.

Die Nephronabschnitte nach der Macula Densa lassen sich morphologisch anhand unterschiedlicher Zelltypen in das distale Konvolut (DCT), das Übergangsstück (CNT) und das kortikale Sammelrohr (CCD) unterteilen. Der DCT lässt sich aufgrund spezifischer Transporter und Kanäle weiter untergliedern in das frühe (DCT1) und das späte distale Konvolut (DCT2). Im Wesentlichen unterscheiden sich die beiden Unterabschnitte des DCT durch die An- bzw. Abwesenheit von Ca^{2+} -Kanälen und -Transportern. Eine Besonderheit der DCT-Zellen besteht darin, dass in diesen Zellen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen auf *transzellulärem* Weg rückresorbiert werden, während stromaufwärts die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Rückresorption überwiegend auf *parazellulärem* Weg durch die Tight Junctions hindurch erfolgt. Der parazelluläre Weg unterliegt jedoch nur zu einem geringen Teil einer adaptiven Regulation, wohingegen der transzelluläre Transportweg im DCT sehr stark hormonell reguliert wird. So wird die Ca^{2+} -Rückresorption im distalen Tubulus unter anderem über die Hormone Calcitonin, Calcitriol, Parathormon (PTH), Vitamin D3 und Klotho reguliert [2–5] und die Mg^{2+} -Rückresorption über den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) [6, 7].

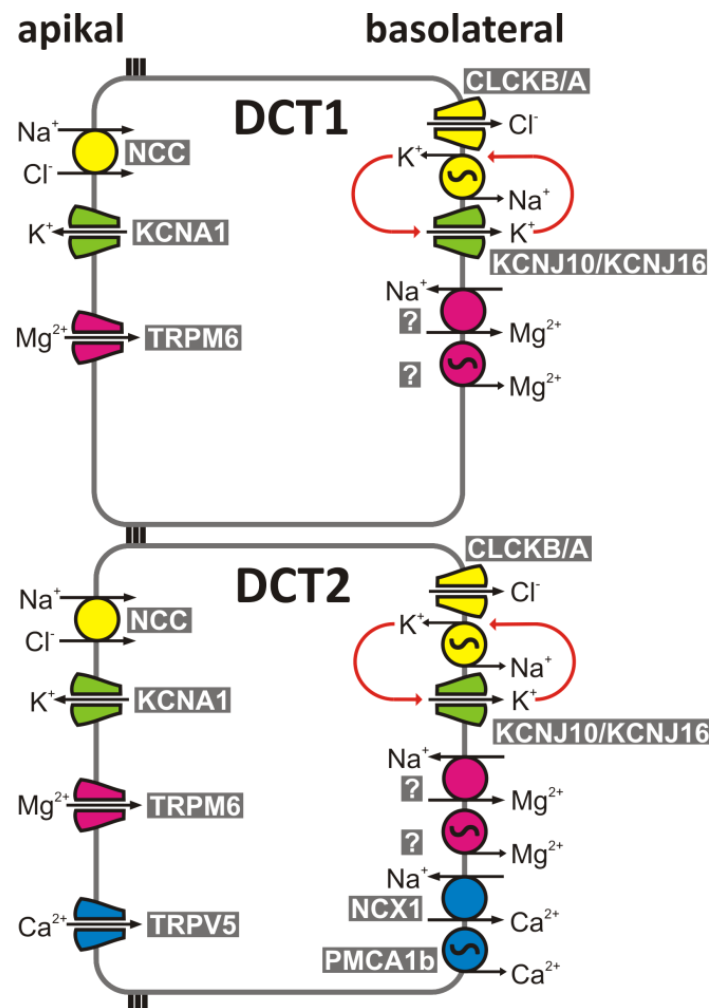


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Zellen des frühen und späten DCT

DCT1 und DCT2 unterscheiden sich durch die Fähigkeit der Ca^{2+} -Rückresorption (Ca^{2+} -Transportproteine sind in blau dargestellt). In beiden Abschnitten findet eine Rückresorption von Na^+ , Cl^- (gelb) und Mg^{2+} (violett) statt. Die genauen Exportmechanismen von Mg^{2+} über die basolaterale Membran sind zum Teil noch unbekannt.

In Abbildung 2 sind Zellen des DCT1 und DCT2 mit ihren jeweils charakteristischen Transportproteinen schematisch dargestellt. Morphologisch zeichnet sich die basolaterale Membran des DCT durch tiefe Einfaltungen aus, die in Abbildung 2 jedoch aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt sind. In diesen Membranfalten liegen zahlreiche Mitochondrien, um der in der basolateralen Membran lokalisierten Na^+ - K^+ -ATPase die benötigte Energie bereit zu stellen. Die Na^+ - K^+ -ATPase stellt nicht nur im DCT, sondern entlang des gesamten Nephrons den wichtigsten Motor für praktisch alle Rückresorptionsprozesse dar. Dieser primär aktive Transporter pumpt in jedem Zyklus unter Verbrauch von ATP zwei K^+ -Ionen in die Zelle und drei Na^+ -Ionen aus der Zelle. Der dadurch generierte Natriumgradient ist eine wichtige Triebkraft für die sekundär-aktiven

Transporter und damit für alle tubulären Rückresorptionsprozesse. Die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ reichert durch ihre Aktivität intrazellulär Kaliumionen an. Diese werden von der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ allerdings wieder für weitere Transportprozesse benötigt und müssen daher „recycelt“ werden. Deshalb befinden sich in enger Nachbarschaft zur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ Kaliumkanäle, die für eine hohe Kaliumleitfähigkeit der basolateralen Membran sorgen und damit einerseits der Aufrechterhaltung des Membranpotentials und andererseits dem notwendigen „Recycling“ der Kaliumionen dienen. Dieses enge Zusammenspiel zwischen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und benachbarten Kaliumkanälen ist als das sog. „pump-leak coupling“-Modell bekannt, das zum ersten Mal in einer Arbeit von Koefoed-Johnsen und Ussing im Jahr 1958 beschrieben wurde [8]. Laut den Autoren ist in Epithelien mit hohen Transportraten die Verfügbarkeit von extrazellulären Kaliumionen der geschwindigkeitsbestimmende Faktor für die Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Daher ist für die reibungslose Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ das Recycling von Kaliumionen über die basolaterale Membran unabdingbar. Im distalen Nephron sind mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit heteromere KCNJ10/KCNJ16-Kanäle für dieses Kalium-Recycling zuständig [9, 10].

Durch die Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ wird neben dem chemischen Natriumgradienten auch ein elektrischer Gradient erzeugt, da bei jedem Pumpzyklus netto eine positive Ladung die Zelle verlässt. Beide Gradienten können für die weiteren Transportvorgänge im DCT genutzt werden. Der thiazid-sensitive $\text{Na}^+\text{-Cl}^-\text{-Cotransporter}$ (NCC oder NCCT) beispielsweise transportiert Cl^- -Ionen mit Hilfe des Natriumgradienten in die Zelle. Auf der basolateralen Seite verlässt Cl^- die Zelle dann über spannungsgesteuerte Chloridkanäle (CLCKA/B). Auch die basolateralen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Antiporter nutzen den Natriumgradienten für den sekundär-aktiven Transport von Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} aus der Zelle. Dies wiederum erzeugt Gradienten, die den Eintritt von Ca^{2+} und Mg^{2+} auf der apikalen Seite erleichtern. Über viele verschiedene Mechanismen werden die Rückresorptionsvorgänge im DCT genauestens reguliert. So spielen z. B. wie oben erwähnt zahlreiche Hormone eine Rolle bei der Regulation der Ca^{2+} und Mg^{2+} Aufnahme. Auch der NCC wird hormonell über Angiotensin II mittels einer Signalkaskade reguliert, an der sogenannte „with-no-lysine“-Kinasen (WNK-Kinasen) und weitere Kinasen beteiligt sind [11–14]. Über die hormonelle Regulation der Rückresorptionsprozesse kann die Zusammensetzung des Endurins genau an die Bedürfnisse des Körpers angepasst werden.

1.1.2 Erkrankungen des DCT

Eine Beeinträchtigung der renalen Rückresorptionsvorgänge hat meist weitreichende Auswirkungen auf den gesamten Organismus. Bei Patienten, die an einer sog. renalen Tubulopathie leiden, wird dies besonders deutlich. Bei diesen Erkrankungen des Tubulussystems der Niere liegt i. d. R. eine Funktionsbeeinträchtigung oder ein vollständiger Funktionsverlust eines bestimmten Transportproteins vor. In Einzelfällen kann die Resorptionsstörung auch hormonell bedingt sein. Die meisten renalen Tubulopathien sind jedoch genetisch bedingte, monogene Erkrankungen, die man primäre Tubulopathien nennt und die meist rezessiv vererbt werden. Bei den sog. sekundären Tubulopathien ist die Rückresorption nicht durch genetische Defekte, sondern sekundär durch eine Schädigung der Tubuluszelle gestört. Bei den meisten Tubulopathien gehören renale Salzverluste und Polyurie zu den Leitsymptomen. Je nach betroffenem Tubulussegment treten jedoch noch weitere, für die jeweilige Tubulopathie charakteristische Symptome auf [15, 16]. Obwohl der DCT anteilmäßig nur relativ wenige Elektrolyte rückresorbiert, können auch Störungen in diesem Segment zu ausgeprägten Symptomen führen. Das Gitelman-Syndrom, das Bartter-Syndrom Typ III, Pseudohypoaldosteronismus Typ II (PHA II) und das EAST-Syndrom sind einige Beispiele für Tubulopathien, die den DCT betreffen.

1.1.2.1 Das Gitelman-Syndrom

Das Gitelman-Syndrom manifestiert sich meist erst im Schulalter oder noch später. Es kann völlig symptomlos bleiben oder zu relativ milden Krankheitszeichen wie Muskelschwäche, Müdigkeit und gesteigertem Salzappetit führen. In einigen Fällen kann sich die Erkrankung jedoch auch in schwerwiegenden Symptomen wie Krampfanfällen äußern. Beim Gitelman-Syndrom ist die Funktion des NCC durch eine Mutation im dafür codierenden SLC12A3-Gen beeinträchtigt [17]. Durch die verminderte Na^+ - und Cl^- -Rückresorption werden auch die Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Resorption, die K^+ -Homöostase und der Säure-Basen-Haushalt indirekt beeinträchtigt. Der Salzverlust über den Urin kann auch eine Hypotonie und eine dadurch erhöhte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) zur Folge haben. Laborchemisch lässt sich das Gitelman-Syndrom an der für die Erkrankung typischen Hypomagnesiämie und Hypokalzurie in Verbindung mit einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose feststellen.

1.1.2.2 PHA II

Beim autosomal-dominant vererbten Pseudohypoaldosteronismus (PHA II) liegt keine direkte Funktionsbeeinträchtigung des NCC vor, sondern die Regulation des Transporters ist durch Mutationen im WNK1- oder WNK4-Gen gestört [18]. Beide Serin/Threonin-Kinasen sind an der Regulation der Rückresorptionsprozesse in Aldosteron-sensitiven Nephronsegmenten beteiligt. Physiologischerweise hemmt WNK4 die Aktivität des NCC und wird selbst durch WNK1 inhibiert [18, 19]. Gain-of-function Mutationen von WNK1 oder loss-of-function Mutationen von WNK4 führen somit zu einer gesteigerten Aktivität des NCC, wodurch die Symptome des PHA II genau spiegelbildlich zu denen des Gitelman-Syndroms sind. Zu den charakteristischen Symptomen des PHA II zählen daher eine vermehrte renale Salzretention, Bluthochdruck und eine hyperkaliämische metabolische Azidose [18].

1.1.2.3 Bartter-Syndrom Typ III

Beim autosomal rezessiv vererbten Bartter-Syndrom Typ III (dem sog. „klassischen“ Bartter-Syndrom) ist der Chloridkanal CLCKB durch eine Mutation in seiner Funktion gestört [15, 20, 21]. Auch bei dieser Erkrankung bringt die Beeinträchtigung eines einzigen Proteins alle weiteren Rückresorptionsvorgänge im DCT aus dem Gleichgewicht. Der Phänotyp von Bartter-Patienten kann stark variieren. So reicht die Spannweite der klinischen Manifestation von einem nahezu asymptomatischen Verlauf bis hin zu einer schweren Volumendepletion und Hypokaliämie bereits im Neugeborenenalter [22]. Zu den typischen Symptomen des klassischen Bartter-Syndroms gehören eine stark erniedrigte Chloridkonzentration im Plasma, Hyponatriämie und eine schwere hypokaliämische Alkalose [23]. Meist ist auch der Blutdruck erniedrigt [20]. Anders als beim Gitelman-Syndrom und PHA II ist beim Bartter-Syndrom die renale Mg^{2+} -Ausscheidung meist nicht betroffen. Auch die Ca^{2+} -Ausscheidung über den Urin kann normal oder aber leicht erhöht sein [20].

1.1.2.4 Das EAST-Syndrom

Im Jahr 2009 wurde von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen ein bis dahin unbekanntes Krankheitsbild beschrieben, das neben weiteren Symptomen auch eine renale Tubulopathie beinhaltet: Das EAST- bzw. SeSAME-Syndrom. Das Akronym EAST steht hierbei für **E**pilepsie, **A**taxie, **s**ensorineurale Taubheit und **r**enale **T**ubulopathie [24], während SeSAME eine Abkürzung für die Symptome **S**eizures (engl. für „Krampfanfälle“), **s**ensorineurale Taubheit, **A**taxie, **m**entale Retardierung und **E**lektrolytungleichgewicht darstellt [25]. In der vorliegenden Arbeit wird nur noch die Bezeichnung EAST-Syndrom verwendet. Bei allen bisher bekannten EAST-Patienten trat die Krankheit bereits im Säuglingsalter durch tonisch-klonische Anfälle in Erscheinung. Außerdem zeigten die Betroffenen eine deutliche Entwicklungsverzögerung sowie Sprach- und Bewegungsstörungen [24]. Für einige EAST-Patienten wurde zudem eine mentale Retardierung beschrieben [25].

Bezüglich des renalen Phänotyps ähnelt das EAST-Syndrom sehr stark dem Gitelman-Syndrom. Beiden Krankheiten ist der renale Verlust von Elektrolyten und Wasser, die Hypocalciurie sowie das Auftreten einer hypokaliämischen Alkalose gemeinsam. Die Ähnlichkeit der renalen Symptomatik beider Erkrankungen lässt bereits vermuten, dass auch im Fall des EAST-Syndroms ein Defekt im DCT vorliegt. Es hat sich herausgestellt, dass EAST-Patienten Mutationen im KCNJ10-Gen tragen, das für die Kaliumkanal-untereinheit KCNJ10 codiert. KCNJ10 wird besonders stark in der Niere exprimiert und bildet dort mit KCNJ16 Heteromere. Doch auch im Gehirn und im Innenohr spielt KCNJ10 eine große Rolle, wodurch EAST-Patienten an den oben erwähnten zentralen Symptomen (Ataxien, epileptische Anfälle etc.) und an einer Innenohrschwerhörigkeit leiden. Zum Krankheitsausbruch kommt es nur dann, wenn bestimmte Punktmutationen auf *beiden* Allelen vorliegen. Das EAST-Syndrom wird folglich autosomal rezessiv vererbt. Es kann dabei auch vorkommen, dass beide Allele unterschiedliche Mutationen tragen. Bisher wurden über 15 verschiedene Mutationen bei EAST-Patienten identifiziert, die in Abbildung 3 in einem hypothetischen Modell der KCNJ10-Membrantopologie dargestellt sind. Die meisten Mutationen führen durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure zu einer Missense-Mutation, zwei der bisher bekannten Mutationen verursachen einen Kettenabbruch (R199X und V259X) und zwei weitere Mutationen führen zu einem Frameshift (V91fsX197 und H184fsX197).

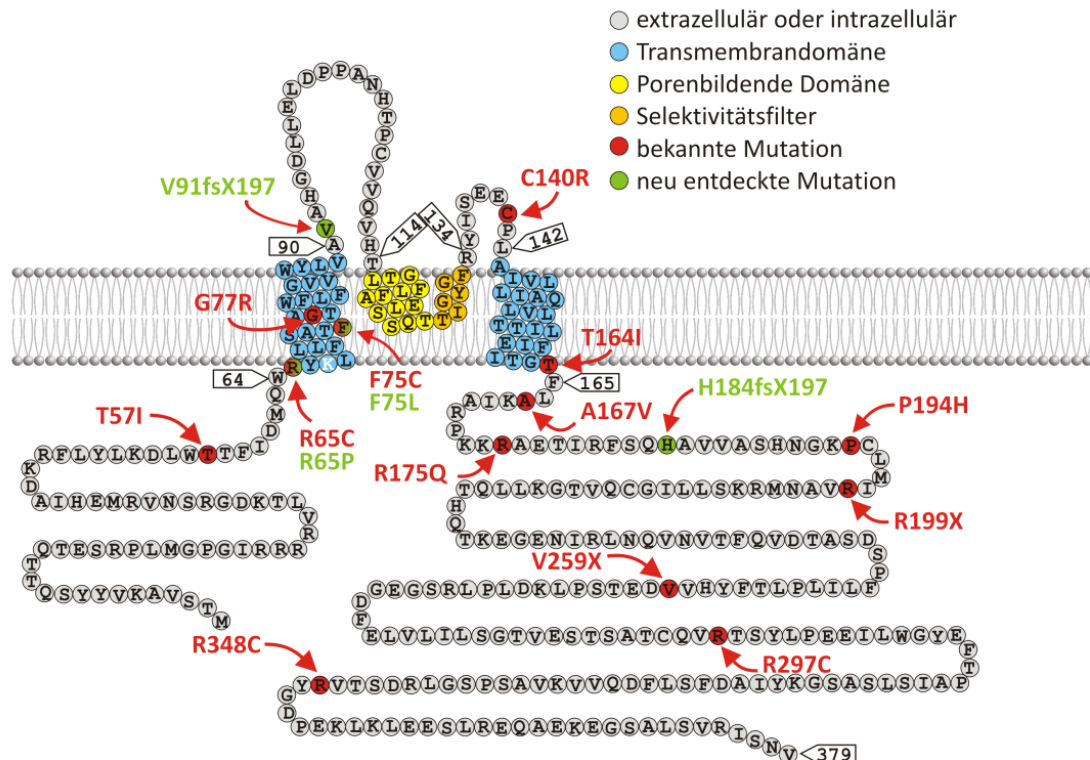


Abbildung 3: Lokalisation der bisher bekannten EAST-Mutationen von hKCNJ10

Schematische Membrantopologie von hKCNJ10 nach SwissProt P78508. In rot sind die bisher publizierten Mutationen eingezeichnet, in grün neu entdeckte und noch nicht publizierte Mutationen. Inzwischen sind Mutationen in fast allen Abschnitten der Kanaluntereinheit bekannt: eine Mutation liegt im N-Terminus, fünf in der ersten Transmembrandomäne, jeweils eine in den extrazellulären Schleifen, eine in der zweiten Transmembrandomäne und acht im C-Terminus. Nur im Bereich der porenbildenden Domäne ist bisher keine Mutation bekannt.

Alle bisher bekannten Mutationen von KCNJ10 führen dazu, dass die Funktion des heteromeren KCNJ10/KCNJ16-Kanals erheblich beeinträchtigt wird. Dadurch kann der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ vermutlich nicht mehr genügend Kalium zur Verfügung gestellt werden, wodurch deren Funktion ebenfalls gestört wird. Infolgedessen können alle weiteren sekundär-aktiven Transportprozesse in den Zellen des DCT nicht mehr normal ablaufen und es kommt zum Verlust von Na^+ , Cl^- , K^+ und Mg^{2+} über den Urin. Obwohl man auch einen renalen Ca^{2+} -Verlust erwarten könnte, scheiden EAST-Patienten genau wie Gitelman-Patienten weniger Ca^{2+} aus als gesunde Personen. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in einer Überkompensation des erhöhten Ca^{2+} -Verlustes im DCT in anderen Tubulusabschnitten [26].

Bisher ist nur eine einzige Patientin mit EAST-ähnlichen Symptomen bekannt, die eine Mutation im KCNJ16-Gen trägt, das für die Partneruntereinheit von KCNJ10 codiert (noch nicht publizierte Daten von Schlingmann *et al.* [27]). Dennoch ist dies ein eindeutiger Hinweis darauf, dass auch die KCNJ16-Untereinheit eine wesentliche Rolle bei Resorptionsprozessen in der Niere spielt.

1.2 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle im DCT

1.2.1 Klassifizierung, Struktur und Regulation von Kaliumkanälen

KCNJ16 und KCNJ10 gehören zur größten und vielfältigsten Gruppe aller Ionenkanäle, den Kaliumkanälen. Praktisch alle Zelltypen in allen bekannten Organismen benötigen mindestens einen Kaliumkanaltyp, um überleben zu können [28]. Allein im humanen Genom sind inzwischen ca. 80 verschiedene Gene beschrieben, die für porenbildende Einheiten (α -Untereinheiten) von Kaliumkanälen codieren.¹ Durch Spleissvarianten und Heteromerbildung ergibt sich daraus eine enorme Vielfalt an strukturell und funktionell unterschiedlichen nativen Kaliumkanälen [28, 29, 30–32]. Üblicherweise teilt man die Kaliumkanaluntereinheiten nach der Anzahl ihrer Transmembrandomänen (TM) in drei große Familien ein (vgl. Abbildung 4):

1. Die 2-TM-Familie, deren Vertreter zwei Transmembrandomänen und eine porenbildende Domäne (P-Domäne) besitzen. Zu dieser Gruppe gehören die einwärtsgleichrichtenden Kir-Kanäle, die G-Protein-gekoppelten GIRK-Kanäle sowie die ATP-sensitiven K_{ATP} -Kanäle [33].
2. Die 4-TM-Familie, deren Mitglieder aus vier Transmembrandomänen und zwei P-Domänen bestehen und daher auch 2-P-Domänen-Kaliumkanäle genannt werden. Die Kanäle der 4-TM-Familie können anhand von funktionellen und strukturellen Unterschieden weiter unterteilt werden in die Subfamilien TWIK, TASK, TREK, THIK, TALK und TRESK [34].

¹ Vgl. <http://www.genenames.org/genefamilies/KCN>

3. Die 6-TM-Familie, deren Vertreter sechs oder sieben Transmembrandomänen und eine P-Domäne besitzen. Dieser Familie gehören im Wesentlichen die spannungsabhängigen K_v -Kanäle und die Ca^{2+} -aktivierten KCa -Kanäle an [33].

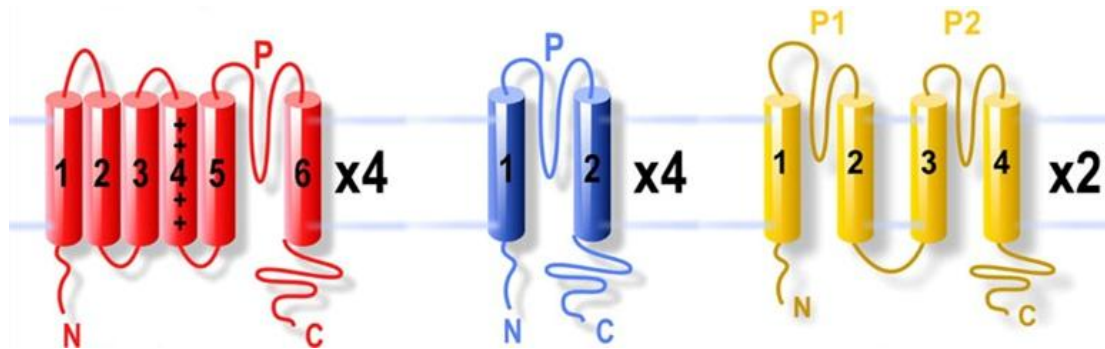


Abbildung 4: Membrantopologie der drei großen Kaliumkanalfamilien

Die Grundstruktur aller Kaliumkanaluntereinheiten ist sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in der Anzahl ihrer Transmembrandomänen und ihrer P-Domänen. Rot: 6-TM-Familie, blau: 2-TM-Familie, gelb: 4-TM-Familie (2P-Domänen-Kaliumkanäle) (modifizierte Abbildung nach [35]).

Für die Benennung von Kaliumkanälen existieren (neben diversen Bezeichnungen anhand ihrer funktionellen Eigenschaften) zwei konkurrierende Klassifikationssysteme: Die Nomenklatur nach dem HGNC (Human Genome Nomenclature Committee) und die Nomenklatur nach der IUPHAR (International Union of Pharmacology). Für weitere Informationen zur Benennung von Kaliumkanälen sei auf die beiden Internetseiten <http://www.genenames.org/genefamily/kcn.php> und <http://www.iuphar-db.org/iupharic/index.html> verwiesen. In dieser Arbeit wird ausschließlich die Nomenklatur nach dem HGNC verwendet.

Die Mehrzahl der Kaliumkanäle ist tetramer aufgebaut, d. h. vier α -Untereinheiten bilden gemeinsam einen funktionsfähigen Kanal. Zudem können diverse β -Untereinheiten mit manchen α -Untereinheiten interagieren, um deren Expressionslevel bzw. -muster, ihre elektrophysiologischen oder ihre biophysikalischen Eigenschaften zu ändern [29]. Eine α -Untereinheit besteht in der Regel aus zwei bis sieben Transmembrandomänen und *einer* porenbildenden Domäne (P-Domäne). Eine Ausnahme hiervon stellen die 2-P-Domänen-Kaliumkanäle dar, bei denen jede α -Untereinheit *zwei* porenbildende Domänen besitzt. Ein funktionsfähiger 2-P-Domänen-Kanal besteht daher entsprechend aus nur zwei statt

vier α -Untereinheiten. Jede P-Domäne einer α -Untereinheit enthält ein hochkonserviertes Sequenzmotiv aus fünf Aminosäuren (TVGYG oder TIGYG), das den eigentlichen Selektivitätsfilter des Kanals bildet und dadurch sicherstellt, dass nur Kaliumionen den Kanal passieren können [36]. Mutationen in diesem Sequenzmotiv können daher zum Verlust der Kanalselektivität führen [37, 38].

Nur die wenigsten der bisher bekannten Kaliumkanäle sind konstitutiv aktiv [28]. In aller Regel wird das „Gating“ eines Kaliumkanals genauestens reguliert, z. B. durch Spannung, Ca^{2+} -Ionen, Neurotransmitter, G-Proteine, Nukleotide, Polyamine, Proteinphosphorylierungen oder über den pH-Wert [28, 39]. Die Aktivität von Kaliumkanälen kann pharmakologisch durch drei große Substanzgruppen moduliert werden: Metallionen (z. B. Cs^{2+} , Ba^{2+} oder Cd^{2+}), kleine organische Moleküle (z. B. Tetraethylammonium oder 4-Aminopyridin) und toxische Peptide (z. B. die im Skorpiongift enthaltenen Peptide Noxiustoxin und Charybdotoxin) [40]. Da die verschiedenen Kaliumkanäle jeweils auf unterschiedliche Aktivatoren und Inhibitoren ansprechen, kann anhand dieser Substanzen experimentell zwischen den einzelnen Kaliumkanaltypen unterschieden werden.

Da die intrazelluläre Kaliumkonzentration rund 40 mal höher ist als die extrazelluläre Konzentration, führt das Öffnen eines Kaliumkanals normalerweise zum Ausstrom positiver Ladung, wodurch die Zelle hyperpolarisiert oder repolarisiert wird. In Neuronen sind Kaliumkanäle daher unter anderem für die Repolarisation nach einem Aktionspotential zuständig. Außerdem sind Kaliumkanäle je nach zellulärer Umgebung an weiteren wichtigen Prozessen beteiligt, z. B. an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials, am Ca^{2+} -Signaling, an der Freisetzung von Neurotransmittern, an Immunfunktionen, an der Regulation des Zellvolumens, an Sekretionsvorgängen, an der Zellproliferation, der Zellmigration und der Apoptose [30, 39, 40, 41].

1.2.2 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle

1.2.2.1 Membrantopologie, Eigenschaften und Funktionen

KCNJ10 und KCNJ16 gehören zu den einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen (Kir-Kanäle). Diese sind, wie bereits erwähnt, Mitglieder der 2-TM-Familie und besitzen somit pro α -Untereinheit zwei Transmembrandomänen und eine P-Domäne, die bei Kir-Kanälen häufig als H5-Region bezeichnet wird [42–45]. In Abbildung 5 ist die Membrantopologie eines typischen Kir-Kanals schematisch dargestellt. Die im Zytosol lokalisierten N- und C-terminalen Domänen machen mehr als die Hälfte des Molekulargewichtes aus und sind an der biologischen Regulation der Kanalöffnung beteiligt [46, 47].

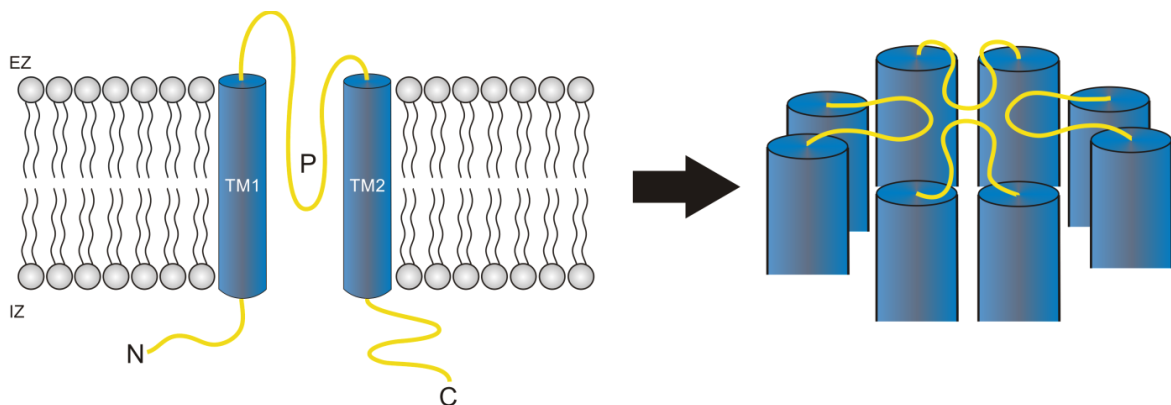


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Membrantopologie eines Kir-Kanals

Links: Darstellung einer Kir-Kanal-Untereinheit. Zwei Transmembrandomänen (TM1 und TM2) durchspannen die Zellmembran (grau), dazwischen liegt die porenbildende Domäne (P). N- und C-Terminus ragen in den Intrazellularraum (IZ). Rechts: Vier Untereinheiten bilden gemeinsam einen Kir-Kanal. Die vier P-Domänen (gelb) bilden die Kanalpore, die selektiv für K^+ -Ionen durchlässig ist.

Kir-Kanäle zeichnen sich durch ihre namensgebende Eigenschaft der Einwärtsgleichrichtung aus [48, 49]. Das bedeutet, dass der Einwärtsstrom von Kaliumionen durch Kir-Kanäle größer ist als der Auswärtsstrom bei gleich großer, aber entgegengesetzter Triebkraft. Die Einwärtsgleichrichtung der Kir-Kanäle beruht auf einer spannungsabhängigen Blockade des Kanals durch intrazelluläre Polyamine (Spermin und Spermidin) sowie Mg^{2+} -Ionen [50]. Trotzdem gehören Kir-Kanäle nicht zu den spannungsabhängigen Kaliumkanälen im engeren Sinne.

Kir-Kanäle finden sich in vielen Zelltypen des menschlichen Körpers und spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des Ruhemembranpotentials. In erregbaren Zellen sind sie außerdem an der Regulation der Dauer von Aktionspotentialen und der Kontrolle der Erregbarkeit beteiligt. Zudem sind sie für die Regulation der Herzfrequenz, die Kaliumhomöostase, die Insulinfreisetzung, den K^+ -Transport in epithelialen Zellen sowie die Entwicklung der Oligodendrocyten und die Myelinisierung von Nervenzellen von Bedeutung [48, 49, 51, 52–54].

1.2.2.2 Einteilung und Regulation

Bislang sind 15 α -Untereinheiten bekannt, die der Familie der Kir-Kanäle angehören. Diese kann in sieben Unterfamilien weiter unterteilt werden. Abbildung 6 zeigt einen phylogenetischen Baum, der die Verwandtschaftsbeziehungen der Kir-Kanal Untereinheiten zueinander darstellt.

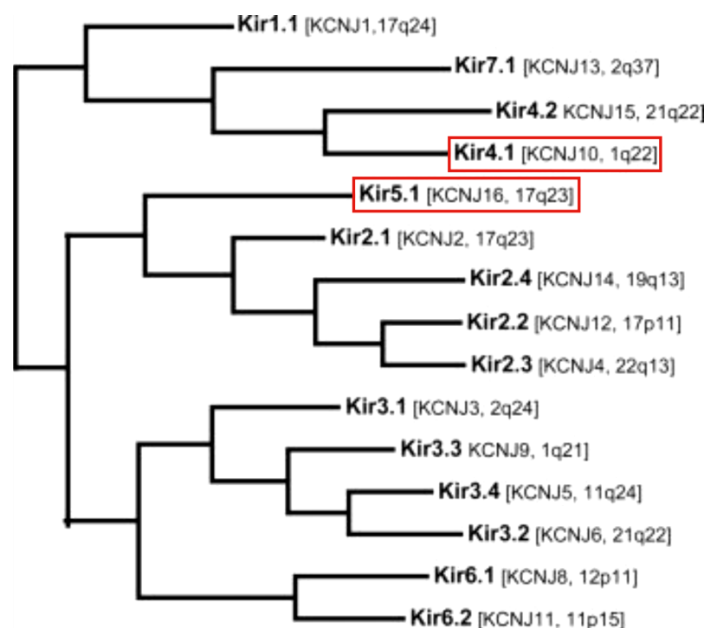


Abbildung 6: Phylogenetischer Baum der Kir-Kanalfamilie

Dargestellt sind die 15 bekannten Kir-Kanaluntereinheiten und ihre Verwandtschaftsbeziehungen zueinander. Die Namen nach der IUPHAR sind fett gedruckt und in Klammern sind jeweils die Bezeichnungen nach dem HGNC sowie die chromosomale Lokalisation der Kanäle aufgeführt. KCNJ10 und KCNJ16, die Gegenstand dieser Arbeit sind, wurden rot umrandet.

(Quelle: <http://www.iuphar-db.org>)

Die einzelnen Kir-Kanäle unterscheiden sich in ihrem Grad der Einwärtsgleichrichtung, ihrer Einzelkanalleitfähigkeit, ihrer Sensitivität gegenüber bestimmten pharmakologischen Blockern sowie in ihren Regulationsmechanismen. Oft werden Kir-Kanäle anhand ihrer Regulation in Untergruppen eingeteilt. Je nach Kir-Kanaltyp erfolgt die Regulation des Kanalgatings über G-Proteine, Phosphoinositide, intrazelluläres Na^+ , ATP oder H^+ [51, 55, 56]. Auch Arachidonsäure, Mg^{2+} -Ionen, Phosphorylierung, Oxidation bzw. Reduktion und Interaktionen mit PDZ-Domänen anderer Proteine können die Aktivität von Kir-Kanälen modulieren [55]. Nahezu alle Kir-Kanäle werden durch Phosphoinositide (z. B. PIP_2) reguliert. Phosphoinositide können sogar als zwingend notwendige Co-Faktoren für Kir-Kanäle angesehen werden, denn in ihrer Abwesenheit kann normalerweise keine Kanalaktivität beobachtet werden. Die hohe Bedeutung der PIP_2 -Regulation von Kir-Kanälen kann man daran sehen, dass Mutationen der PIP_2 -Bindestellen bestimmter Kir-Kanäle zu Krankheiten wie dem Andersen-Syndrom, dem Bartter-Syndrom Typ II oder Hyperinsulinämie führen können [57]. Weitere wichtige Regulatoren für die Aktivität von Kir-Kanälen sind die extrazelluläre Kaliumkonzentration und der intrazelluläre pH-Wert. Alle Kir-Kanäle werden durch eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration aktiviert und durch einen niedrigen intrazellulären pH-Wert gehemmt, wobei die pH-Sensitivität je nach Kir-Kanal unterschiedlich stark ausgeprägt ist [53, 58, 59]. Außerdem zeigen alle bekannten Kir-Kanäle eine starke Ba^{2+} -Sensitivität bereits bei mikromolaren Konzentrationen von extrazellulärem Ba^{2+} [29]. Um andere Kaliumkanäle zu hemmen, sind weitaus höhere Ba^{2+} -Konzentrationen nötig. Daher kann Ba^{2+} in Experimenten als relativ selektiver, reversibler Inhibitor von Kir-Kanälen eingesetzt werden. Kir-Kanäle können außerdem durch intrazelluläres Mg^{2+} sowie Spermin und Spermidin geblockt werden, die (wie bereits erwähnt) auch am Mechanismus der Einwärtsgleichrichtung beteiligt sind [46, 60].

1.2.2.3 KCNJ10

KCNJ10 wurde 1995 von Takumi *et al.* zum ersten Mal beschrieben [61]. Die Untereinheit ist auch unter den (größtenteils veralteten) Namen $\text{K}_{\text{AB}}-2$, BIR10, BIRK-1, Kir4.1 und Kir1.2 in der Literatur zu finden. KCNJ10 gehört zu den schwach bis mäßig einwärtsgleichrichtenden Kir-Kanälen. Funktionelle KCNJ10-Kanäle bestehen wie die meisten Kaliumkanäle aus vier Untereinheiten. Dabei kann KCNJ10 als homomerer Kanal vorkommen

oder Heteromere mit KCNJ16 oder KCNJ2 (Kir2.1) bilden. KCNJ10 wird hauptsächlich in Müllerzellen der Retina, in Gliazellen des Gehirns, im Rückenmark, der Cochlea im Innenohr und in der Niere exprimiert [56, 62–65]. Im Gehirn ist KCNJ10 vermutlich am "K⁺ Spatial Buffering" beteiligt, das bei hoher neuronaler Aktivität der Umverteilung überschüssiger Kaliumionen aus dem Extrazellulärraum in Bereiche mit niedrigerer K⁺-Konzentration dient [66, 67]. Ohne dieses räumliche K⁺-Buffering kann es zu einer dauerhaften Übererregbarkeit der Neuronen kommen, die bei EAST-Patienten zu epileptischen Anfällen und Ataxien führt. Im Innenohr ist der KCNJ10-Kanal an der Entstehung und Aufrechterhaltung des endocochleären Potentials entscheidend beteiligt, welches die Grundlage der Signaltransduktion in der Cochlea ist. Die Hörstörungen bei EAST-Patienten lassen sich durch ein verändertes endocochleäres Potential erklären, das durch die KCNJ10-Mutation bedingt ist. In der Niere von C57Bl6-Mäusen und Wistar-Ratten wurde KCNJ10 in der basolateralen Membran des DCT, des CNT und des frühen CCD nachgewiesen, in anderen Mausstämmen und im Menschen wurde zudem eine Expression von KCNJ10 in der TAL des Nierenkortex festgestellt [24, 62, 68, 69]. In diesen Segmenten ist das KCNJ10/KCNJ16-Heteromer für das oben beschriebenen "pump-leak-coupling" von großer Bedeutung, weshalb EAST-Patienten eine ausgeprägte renale Tubulopathie zeigen.

KCNJ10-Homomere sind durch eine hohe Offenwahrscheinlichkeit (70 - 90 %) und eine Einzelkanalleitfähigkeit von 16 - 30 pS charakterisiert [45, 61, 69, 70–72]. Außerdem sind sie wie alle Kir-Kanäle pH- und PIP₂-sensitiv. Die pH-Sensitivität ist bei KCNJ10-Homomeren nur mäßig ausgeprägt und die IC₅₀ liegt bei pH 6,0 bis 6,4. Mittlerweile sind viele verschiedene Aminosäuren bekannt, die an der pH- und PIP₂-Steuerung des Kanals beteiligt sind (vgl. Abbildung 7) [53, 69]. Es wurden inzwischen auch einige Aminosäuren in der zweiten Transmembrandomäne und im C-Terminus identifiziert, die für das Gating und die Gleichrichtung wichtig sind [73, 74]. Für die Interaktion mit KCNJ16 ist ein großer Bereich des proximalen C-Terminus und vermutlich auch die zweite Transmembrandomäne entscheidend [31]. Das PDZ-Bindungsmotiv am Ende des C-Terminus ist für die Expression des KCNJ10-Kanals an der Zelloberfläche verantwortlich [75].

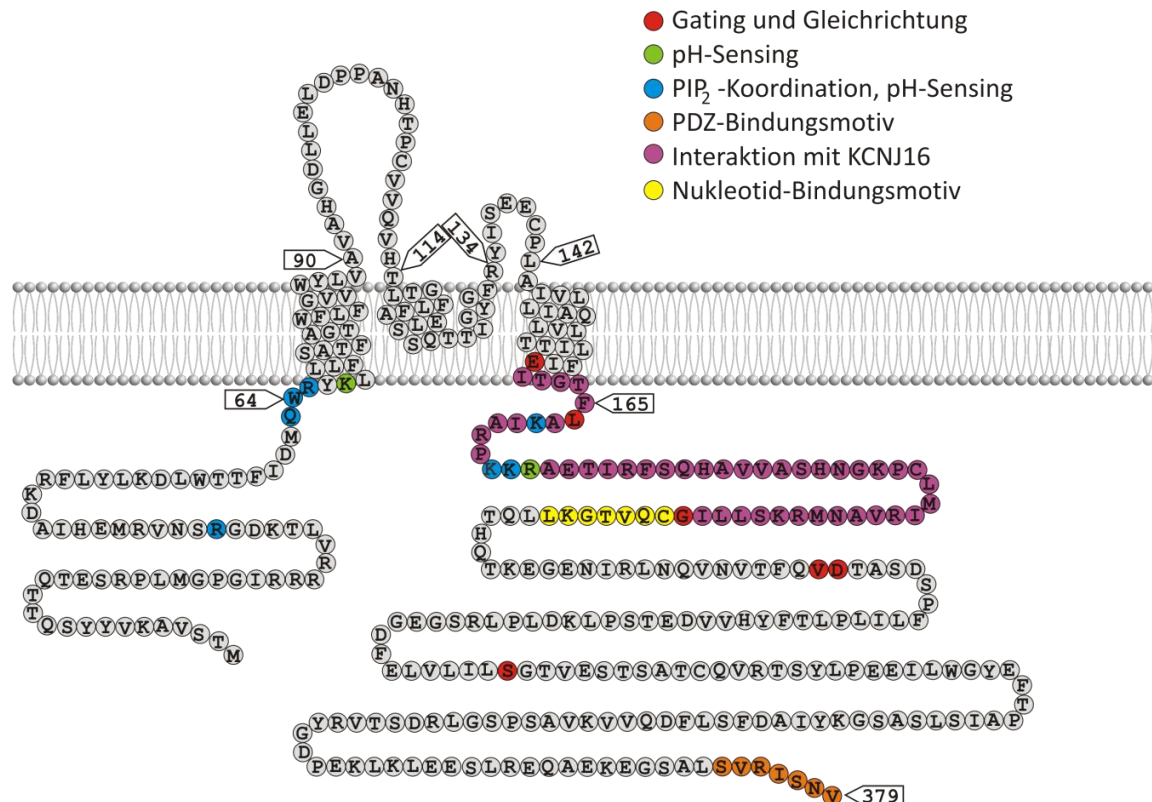


Abbildung 7: Lokalisation bekannter Motive mit wichtigen Funktionen für KCNJ10

Verschiedene Aminosäurereste im N- und C-Terminus sowie am Anfang der ersten Transmembrandomäne sind an der pH-Sensitivität und der PIP₂-Regulation beteiligt (blau und grün markiert). Ein großer Teil des C-Terminus sowie das Ende der zweiten Transmembrandomäne sind für die Heteromerisierung mit KCNJ16 wichtig (violett). Im C-Terminus befinden sich außerdem ein Nukleotid-Bindungsdomäne (gelb) sowie die PDZ-Bindedomäne am Ende des Proteins (orange). Die rot markierten Aminosäurereste sind am Gating und der Einwärtsgleichrichtung beteiligt.

Viele der bereits bekannten Mutationen von KCNJ10 betreffen Aminosäuren, die am Gating, der pH- oder der PIP₂-Regulation beteiligt sind. So führen die Mutationen R65P und R175Q beispielsweise zu einem deutlichen Shift der pH-Sensitivität. Durch diesen pH-Shift ist KCNJ10 bereits in physiologischen pH-Bereichen deutlich in seiner Funktion beeinträchtigt. Mutationen wie R199X und V259X führen durch einen Kettenabbruch zu einem Verlust der PDZ-Bindedomäne. Dadurch wird KCNJ10 nicht mehr an der Zelloberfläche exprimiert, was einen vollständigen Funktionsverlust zur Folge hat [69, 76].

1.2.2.4 KCNJ16

KCNJ10 kann zwar wie erwähnt auch mit KCNJ2 stabile Tetramere bilden, assembliert jedoch vorrangig mit der Untereinheit KCNJ16 [77, 78]. Dabei liegen die beiden Untereinheiten vermutlich in einer alternierenden Anordnung (J10-J16-J10-J16) vor [70]. KCNJ16 (Kir5.1, BIR9) wurde mit Hilfe von Northern Blot Analysen in humanem Nieren-, Pankreas- und Schilddrüsengewebe nachgewiesen [79]. Außerdem wurde bei Ratten eine Expression von KCNJ16 im Gehirn, in Spermatozoen und Sperma-bildendem Gewebe, der Milz, den Nebennieren, der Leber, der Cochlea und der Retina festgestellt [80–83].

Die Lokalisation von KCNJ16 in der Niere von C57Bl6- bzw. CD1-Mäusen und Harlan-Sprague-Dawley-Ratten deckt sich fast vollständig mit der Lokalisation von KCNJ10: Beide Proteine finden sich in DCT-, TAL- und CCD-Zellen [9, 68, 69]. Derst *et al.* haben in humanen Nieren zusätzlich eine Expression von KCNJ16 im proximalen Tubulus mittels Real-Time-PCR nachgewiesen [84]. Auch in weiteren Arbeiten wurde eine Genexpression von KCNJ16 im proximalen Tubulus anhand der SAGE-Methode (**s**erielle **A**nalysen der **G**enexpression) in humanen Nieren [85] bzw. anhand immunhistochemischer Färbungen in Rattennieren [9] festgestellt. Einen endgültigen Beweis für die Expression von KCNJ16 im proximalen Tubulus gibt es jedoch noch nicht. Die angebliche Expression von KCNJ16 im proximalen Tubulus kann auch durch Kontamination der per Mikrodissektion gesammelten proximal-tubulären Abschnitte mit anderen Tubulusabschnitten bedingt sein. Es ist zudem noch nicht geklärt, ob KCNJ16 (falls tatsächlich im proximalen Tubulus vorhanden) in der basolateralen oder in der luminalen Membran von Zellen des proximalen Tubulus lokalisiert ist und ob dieser dort als heteromerer Kanal vorliegt.

Im Gegensatz zu KCNJ10 konnte bei KCNJ16 bisher keine Bildung funktionsfähiger Homomere in Expressionssystemen festgestellt werden. Im Gehirn scheint es jedoch funktionelle KCNJ16-Homomere zu geben, die dort vermutlich mit Hilfe des Ankerproteins PSD-95 gebildet werden [86]. Außer mit KCNJ10 kann KCNJ16 auch mit KCNJ15 (Kir4.2) funktionelle Heteromere bilden. Im distalen Nephron der Niere herrschen vermutlich KCNJ10/KCNJ16-Heteromere vor, während im Pankreas, im Magen und in der Leber möglicherweise Heteromere aus KCNJ16 und KCNJ15 existieren [87–89]. Falls die KCNJ16-Untereinheit tatsächlich auch im proximalen Tubulus der Niere exprimiert wird, könnte

dort ebenfalls KCNJ15 als möglicher Partner zur Heteromerbildung fungieren. KCNJ16 moduliert durch die Bildung von heteromeren Kanälen mit KCNJ10 bzw. KCNJ15 die Eigenschaften seiner Partneruntereinheiten [9, 71, 87, 88, 90, 91]. So können sich beispielsweise der Grad der Einwärtsgleichrichtung, die pH-Sensitivität und die Membranlokalisation der Partneruntereinheit ändern.

KCNJ10/KCNJ16-Heteromere zeichnen sich durch eine erhöhte pH-Sensitivität gegenüber KCNJ10-Homomeren aus. Die IC_{50} verschiebt sich von pH 6,0 - 6,4 zu pH 7,2 - 7,45 [31, 71, 88], also in den physiologischen pH-Bereich. Auch die Einzelkanalleitfähigkeit ist bei den KCNJ10/KCNJ16-Heteromeren deutlich erhöht und liegt mit 40 bis 60 pS etwa doppelt so hoch wie die Einzelkanalleitfähigkeit der KCNJ10 Homomere [70–72]. Eine Besonderheit bei KCNJ10/KCNJ16-Heteromeren stellt das Auftreten sogenannter Sublevel dar, deren Leitfähigkeit bei etwa $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ und $\frac{3}{4}$ der Leitfähigkeit eines „regulären“ Levels liegen kann [70, 72, 92]. Die Ursache und Bedeutung dieser Sublevel ist jedoch noch nicht geklärt [72]. Zudem ist bei KCNJ10/KCNJ16-Heteromeren der Grad der Einwärtsgleichrichtung im Vergleich zu KCNJ10 Homomeren erhöht [70, 71], die Offenwahrscheinlichkeit ist jedoch deutlich erniedrigt und liegt bei etwa 40 % [72].

Die Publikationen über eine KCNJ16-Knockoutmaus von Paulais *et al.* und Trapp *et al.* lieferten erste wichtige Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung von KCNJ16 [93, 94]. Ein Fehlen der KCNJ16-Untereinheit führte bei den Knockoutmäusen einerseits zu einem respiratorischen Phänotyp. Dieser äußerte sich vor allem in einer veränderten Reaktion der KCNJ16-Knockoutmäuse auf Hypoxie und normoxische Hyperkapnie. Außerdem zeigten die KCNJ16-Knockoutmäuse einen ausgeprägten renalen Phänotyp. Dieser beinhaltete eine hypokaliämische, hyperchloriämische metabolische Azidose, Hypercalciurie und eine veränderte Reaktion der Knockoutmäuse auf Hydrochlorothiazid. Diese Arbeiten zeigen, dass KCNJ16 für die Atemregulation und die Nierenphysiologie von Bedeutung sind.

Bisher ist nur eine einzige Patientin mit einer renalen Tubulopathie bekannt, die eine Mutation im KCNJ16-Gen trägt (noch nicht veröffentlichte Daten von [27]). Diese Patientin weist die homozygote Missense-Mutation R137C auf (vgl. Abbildung 8). Diese

Mutation hat eine hypochloriämische, hypokaliämische Alkalose, Hypomagnesiämie sowie Hyponatriämie zur Folge. Es wurden auch Taubheit und eine mentale Retardierung bei der Patientin festgestellt. Die Symptome sind daher denen des EAST-Syndroms sehr ähnlich. Trotzdem kann hier vielleicht von einem eigenen Krankheitsbild gesprochen werden, da durch die etwas unterschiedlichen Expressionsmuster von KCNJ16 und KCNJ10 auch Abweichungen in den Krankheitssymptomen bestehen. So leiden praktisch alle EAST-Patienten an Ataxien, epileptischen Anfällen und Mikrozephalie, wohingegen diese Symptome bei der Patientin mit der KCNJ16-Mutation völlig fehlen. Es ist davon auszugehen, dass in naher Zukunft weitere Patienten mit dieser oder anderen KCNJ16-Mutationen identifiziert werden. Diese eine bekannte Patientin liefert jedoch bereits eindeutige Hinweise darauf, dass die KCNJ16-Untereinheit auch beim Menschen von hoher Relevanz für die Rückresorptionsvorgänge in der Niere ist.

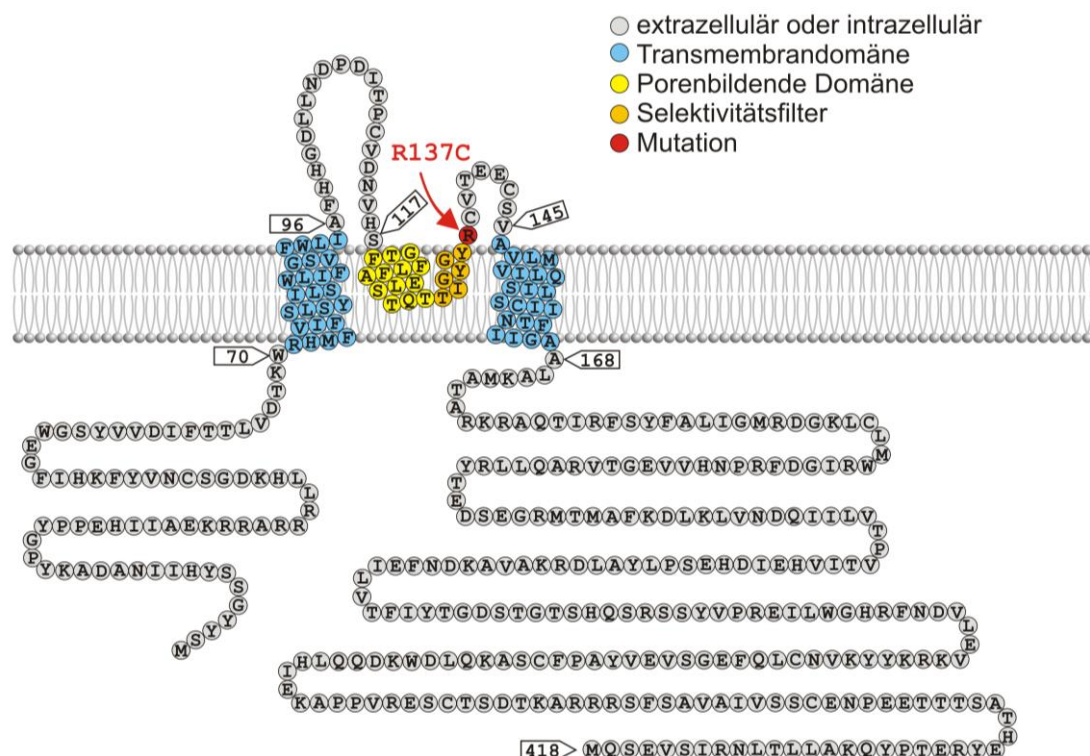


Abbildung 8: Lokalisation der einzigen bisher bekannten hKCNJ16-Mutation

Schematische Membrantopologie nach SwissProt (Q9NPI9). Die einzige bisher bekannte Mutation von KCNJ16 (rot markiert) liegt sehr nahe am Selektivitätsfilter der P-Domäne (orange). Es ist davon auszugehen, dass in Zukunft noch weitere Mutationen im KCNJ16-Gen bei Patienten gefunden werden.

2. Zielsetzung

Die Nieren sind wesentlich an der Wasser- und Elektrolythomöostase und somit auch an der Blutdruckregulation beteiligt. Obwohl im DCT im Vergleich zu anderen Tubulusabschnitten verhältnismäßig wenig Rückresorption stattfindet, führen Störungen in diesem Segment zu (teils erheblichen) Beeinträchtigungen der Körperfunktionen. Im Falle von EAST-Patienten wird dies besonders deutlich: Hier führt die Mutation der Kaliumkanaluntereinheit KCNJ10 unter anderem zu einer renalen Tubulopathie, die durch den Verlust von NaCl und Wasser über den Urin, eine Hypocalciurie und eine hypokaliämische Alkalose charakterisiert ist. KCNJ10 bildet in Zellen des distalen Nephrons heteromere Kaliumkanäle mit KCNJ16, die für das Recycling von K^+ -Ionen über die basolaterale Membran verantwortlich sind. Mutationen der KCNJ10-Untereinheit führen zur Funktionsbeeinträchtigung oder zum vollständigen Funktionsverlust des Kanals. Das dadurch gestörte K^+ -Recycling führt zu den renalen Symptomen der EAST-Patienten.

Bisher ist nur wenig über die physiologische Rolle der KCNJ16-Untereinheit bekannt. Die Arbeit von Paulais *et al.* an einer KCNJ16-Knockoutmaus liefert allerdings deutliche Hinweise darauf, dass auch die KCNJ16-Untereinheit für die Rückresorptionsprozesse in der Niere sehr wichtig ist [93]. Auch die noch nicht veröffentlichte Arbeit von Schlingmann *et al.* über die bisher einzige bekannte Patientin mit einer Mutation im KCNJ16-Gen verdeutlicht die Relevanz von KCNJ16 für die Nierenfunktion [27]. Zudem ist KCNJ16 nicht nur in der Niere, sondern auch im Gehirn, im Innenohr, der Schilddrüse und weiteren Organen exprimiert und könnte somit auch für andere wichtige Körperfunktionen eine Rolle spielen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe des KCNJ16-Knockoutmausmodells zu einem tieferen Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung von KCNJ16 beizutragen. Der Fokus der Arbeit lag dabei auf der Relevanz von KCNJ16 für die Nierenfunktion.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Bezogen von
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, D
CHO	Ovarzellen des chinesischen Hamsters	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, D
XL1-Blue	Kompetente <i>E. coli</i> Bakterien	Agilent Technologies GmbH & Co.KG, Waldbronn, D

3.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller, Ort
Analysenwaage GR-120	A&D Instruments Ltd., Abingdon, U.K
Augenschere und weitere chirurgische Instrumente	F S T Fine Science Tools Inc., Foster City, CA, USA
AVL Electrolyte Analyzer 9180	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
Blutdruckmessanlage TSE Blood pressure monitor	TSE systems Inc., Chesterfield, MO, USA
Blutgasanalysegerät pHox plusM	Nova biomedical, Waltham, MA, USA
Elektroporationsgerät Neon Transfection System Invitrogen	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Fluorespektrometer Nanodrop 3300	Thermo Scientific, NanoDrop products, Wilmington, NC, USA
Gasmischeinheit für Isofluran-Verdampfer	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, D
Gelelektrophoresesystem	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Gelelektrophoresesystem	BioRAD Laboratories, Hercules, CA, USA
Hämatokritzentrifuge Biofuge haemo	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Infusor	Infusors AG, Bottmingen, CH
Inversmikroskop Axiovert 10	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D
Inversmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D
Inversmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D

Ionenchromatograph ICS-1600 Dionex	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Isofluran-Verdampfer Vapor 19.3	Drägerwerk AG, Lübeck, D
Konfokales Mikroskop LSM510	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D
Kryostat Leica CM3050	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
Light Cycler LC480	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
Mikromanipulator PatchStar	Scientifica, East Sussex, UK
Mikrotiterplatten-Photometer TECAN Sunrise	Tecan Group AG, Männedorf, CH
Milli-Q-Anlage Biocel A10	Merck KGaA, Darmstadt, D
Minizentrifuge	Labnet International Inc., Edison, NJ, USA
Oszilloskop	Hameg Instruments GmbH, Mainhausen, D
pH-Meter CG 818	Schott AG, Mainz, D
Perfusor Precidor 902681	Ifors AG, Bottmingen, CH
Pipetten-Puller DMZ Universal Puller	Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, D
Pipettiereinheit Midi Plus	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, FIN
Plattenzentrifuge Z300	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, D
PowerLab 4/30	ADInstruments Ltd., Tokyo, J
PowerLab 4/35	ADInstruments Ltd., Tokyo, J
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
Rollerpumpe Ismatec REGLO analog	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim- Mondfeld, D
Schüttelinkubator	Gallenkamp/Weiss Technik UK, Leicestershire, UK
Spectrophotometer Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, NanoDrop products, Wilmington, NC, USA
Stereomikroskop Stemi SV6	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D
Sterilbank Holten LaminAir	Heto Holten AS, Allerød, DK
Thermocycler Biometra T Personal	Biometra GmbH, Göttingen, D
Thermocycler Biometra T Professional Basic Gradient	Biometra GmbH, Göttingen, D
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Transducer für artiiellen Blutdruck (Isotec)	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D
Transducer Amplifier Modul TAM- A Type 705/1	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D

Ultraschallreinigungsgerät Branson Ultrasonic Cleaner 2510	BRANSON ULTRASCHALL, Niederlassung der EMERSON Technologies GmbH & Co. OHG, Dietzenbach, D
Verstärker EPC-10	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, D
Verstärker ähnlich EPC-7	U. Fröbe und R. Busche, Institut für Physiologie, Freiburg, D
Vortexer Modell Vortex Genie	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Wärmeschrank Modell 300	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, D
Waage Modell EK-600	ADInstruments Ltd., Tokyo, J
Wipptisch Minirocker MR-1	BioSan Ltd., Riga, LV
Zentrifuge Hereaus Fresco21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zentrifuge Hereaus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

3.1.3 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller, Ort
Einwegpipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Deckgläser rund	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, D
Glaskapillaren	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D
Hämatokritkapillaren (heparinisiert)	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, D
Insulinspritzen (0,5 ml)	BD Micro-Fine+, BD Consumer Healthcare, Heidelberg, D
Kapillaren für Blutgasanalysen	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
Kulturschalen Nunc	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Labortücher	Kimberly-Clark Corporation, Dallas, TX, USA
Latexhandschuhe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Mounting-Medium (fluoreszenz- frei)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
Nitrilhandschuhe	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
PCR-Tubes	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
PE-Schlauch (für Katheter)	Benno Kummer, Freiburg, D

Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl und 200 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Polysin Objektträger	O. Kindler GmbH, Freiburg, D
Reaktionsgefäße (1 ml und 1,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Sterilfilter Millipore (0,22 µm)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Tissue-Tek Einbettmedium	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL
Tubes (15 ml und 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
96-well Platten (PCR)	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
96-well Platten (Real-Time PCR)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D

3.1.4 Chemikalien, Enzyme und Substanzen

Substanz	Hersteller, Ort
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, D
Amilorid Hydrochlorid Hydrat	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
ATP Na ₂ (Dinatriumsalz)	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
BaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, D
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Bacto-Peptone	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Bacto yeast extract	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Bovine albumin	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Bovine fibronectin	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
BSA Fraction V	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
BSA 100x	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., D
CaCl ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Collagen from calf skin solution	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
DynaBeads CD8	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
D-Kaliumgluconat	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
dNTPs	QIAGEN GmbH, Hilden, D
DPB	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK

EGTA	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
F-12 (Ham) Nutrient Mixture	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
FCS	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, D
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
Heparin-Lösung Liquemin N 25.000 I.E./5 ml	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Hydrochlorothiazid	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Inulin-FITC	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Isotone NaCl-Lösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
K_2HPO_4	Merck KGaA, Darmstadt, D
$KH_2PO_4 \cdot 3 H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt, D
KOH	Merck KGaA, Darmstadt, D
L-Glutamin, 200 mM (100x)	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Lipofectamine	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
MEM alpha medium	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
2-Methylbutan	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
M-MLV RT RNase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
M-MLV RT 5x Buffer	Promega Corporation, Madison, WI, USA
$MgCl_2$	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt, D
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, D
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt, D
$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt, D
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, D
Na-Pyruvat, 100 mM Lösung	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
NH_4 -Acetat	Merck KGaA, Darmstadt, D
OptiMEM	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK

Paraffinöl	Paraplast-Plus Paraffin, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, D
Penicillin-Streptomycin-Lösung, 10.000 I.E./ml PEN, 10.000 µg/ml STREP	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Proteinase K	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Puffer 4 10x	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., D
Random Hexamer Primer (100 µM)	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Restriktionsenzym DpnI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., D
Restriktionsenzym NotI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., D
RNAse Inhibitor	Promega Corporation, Madison, WI, USA
SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Silikon-Hochvakuumfett	Merck KGaA, Darmstadt, D
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, D
TAE-Puffer (50 x)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (10x) 0,5% Trypsin, 5,3 mM EDTA	Invitrogen/Life Technologies Ltd., Paisley, UK

3.1.5 Kits

Name des Kits	Hersteller
Advantage 2 PCR Kit	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA
Aldosterone ELISA	IBL International GmbH, Hamburg, D
Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, D
NucleoSpin Plasmid	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D
NucleoBond Xtra MIDI	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D
REDTaq Ready Mix	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, D
SYBR Green PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, D

3.1.6 Primer

Primer für (Real-Time) PCR:

Zielgen	Primer	Sequenz	Annealing-T.
m-KCNJ10	Sense:	AGTCTTGGCCCTGCCTGT	55 °C
	Antisense:	TTAGCGACCGACGTCATCT	
m-KCNJ15	Sense:	TAGCCAGGTGGGAGAAGG	59 °C
	Antisense:	ACTGGACATGCCAAGGTG	
m-KCNJ16	Sense:	TACCGCTGTGTCAACGAAGA	60 °C
	Antisense:	GCCAAGGCTGCTCCAATGAT	
m-Klotho	Sense:	TCTCAAGAAGTTCATAATGGAAACC	56 °C
	Antisense:	CAGAAAGTCAACGTAGAAGAGTCCT	
m- β -Actin	Sense:	CCACCGATCCACACAGAGTACTT	60 °C
	Antisense:	GACAGGATGCAGAAGGAGATTACTG	

Genotypisierungs-Primer:

m-KCNJ16	Sense:	AGAGCATGCCATCGCTGAGA	63 °C
Wildtyp	Antisense:	CGCTTAATAGGTCTCCGTGATG	
m-KCNJ16	Sense:	GCAGCGCATCGCCTTCTATC	60 °C
Knockout	Antisense:	TACAACTCTACTGCCAAAGC	

(m = Maus)

Primer für die site-directed mutagenesis:

h-KCNJ16	Sense:	GGATATGGTTATTGCTGTGTTACTG	55 °C
R137C	Antisense:	CAGTAACACAGCAATAACCATATCC	

(h = human)

3.1.7 PCR-Programme

Genotypisierungs-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
1	94 °C	4 min	-
2	94 °C	15 sec	10 x (Schritt 2 bis 4)
3	65 °C	30 sec	
4	72 °C	25 sec	
5	94 °C	15 sec	30 x (Schritt 5 bis 7)
6	55 °C	30 sec	
7	72 °C	25 sec	
8	72 °C	2 min	-
	4 °C	∞	-

cDNA-Synthese

Schritt	Temperatur	Zeit
1	20 °C	10 min
2	50 °C	50 min
3	70 °C	15 min
4	10 °C	∞

Real-Time PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
1	95 °C	10 min	-
2	95 °C	15 sec	50 x (Schritt 2 bis 4)
3	55 - 60 °C ²	20 sec	
4	72 °C	20 sec	
5	95 °C	5 sec	-
6	56 °C	1 min	-
7	72 °C	∞	-

Site-directed Mutagenesis

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
1	94 °C	3 min	-
2	94 °C	1 min	18 x (Schritt 2 bis 4)
3	55 °C	1 min	
4	68 °C	7 min	
5	68 °C	1 h	-
6	4 °C	∞	-

3.1.8 Plasmide

Insert	Vektor	Resistenz	Mutation
hKCNJ10	pIRES CD8	Ampicillin	Keine (= KCNJ10 Wildtyp)
hKCNJ16	pIRES CD8	Ampicillin	Keine (= KCNJ16 Wildtyp)
hKCNJ16	pIRES CD8	Ampicillin	R137C

(h = human)

² Je nach verwendeten Primern

3.1.9 Medien

HEK-Medium

MEM alpha Medium (500 mL)
+ 10 % FCS (hitzeinaktiviert)
+ 50 I.E./ml PEN, 50 µg/ml STREP

CHO-Medium

MEM alpha Medium (500 mL)
+ 10 % FCS (hitzeinaktiviert)
+ 50 I.E./ml PEN, 50 µg/ml STREP
+ 1 % L-Glutamin
+ 1% Na-Pyruvat

Coating-Medium

48,5 ml F-12 (Ham) Nutrient Mixture
+ 0,5 ml Fibronectin
+ 0,5 ml Collagen from calf skin
+ 25 µl Bovine albumin
+ 50 I.E./ml PEN, 50 µg/ml STREP

LB-Medium

10 g Bacto-Peptone
5 g Bacto yeast extract
10 g NaCl (M: 58,44 g/mol)
MilliQ ad 1 L
pH 7,0; autoklaviert

LB-Platten

Zutaten wie bei LB-Medium plus 15 g Bacto-Agar. Das LB-Medium wurde mit MilliQ auf 1 l aufgefüllt, autoklaviert und auf 55 °C abgekühlt. Dann wurden dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugeben bevor es in Plastikpetrischalen gegossen wurde.

3.1.10 Lösungen und Mastermix-Ansätze

1 x Ringer

Substanz	MW	mmol/l
Hepes	238,31	5,0
NaCl	58,44	145,0
K ₂ HPO ₄ • 3 H ₂ O	228,23	1,6
KH ₂ PO ₄	136,09	0,4
Glucose	198,00	5,0
MgCl ₂	203,30	1,0
CaCl ₂	110,99	1,3

pH 7,4 (eingestellt mit 1 M NaOH- bzw. HCl-Lösung)

Hochkalium-Ringer

Substanz	MW	mmol/l
Hepes	238,31	5,0
NaCl	58,44	98,6
KCl	74,56	46,4
K ₂ HPO ₄ • 3 H ₂ O	228,23	1,6
KH ₂ PO ₄	136,09	0,4
Glucose	198,00	5,0
MgCl ₂	203,30	1,0
CaCl ₂	110,99	1,3

pH 7,4 (eingestellt mit 1 M NaOH- bzw. HCl-Lösung)

Pipettenlösung 4

Substanz	MW	mmol/l
K-Gluconat	234,25	95,00
KCl	74,56	30,00
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	137,99	1,20
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	177,99	4,80
Glucose	180,16	5,00
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	203,3	2,38
CaCl ₂	110,99	0,73
EGTA	380,35	1,00
ATP Na ₂	551,0	3,00

pH 7,2 (eingestellt mit 1 M KOH- bzw. HCl-Lösung)

1 x PBS-Puffer

Substanz	MW	mmol/l
NaCl	58,440	137,0
KH ₂ PO ₄	136,090	1,8
Na ₂ HPO ₄	141,960	10,3

pH 7,4 (eingestellt mit 1 M NaOH- bzw. HCl-Lösung)

Fixierlösung I

Substanz	MW	mmol/l
NaCl	58,440	90,0
K ₂ HPO ₄	174,180	15,0
EGTA	380,400	1,0
MgCl ₂	203,300	2,0
Saccharose	342,300	100,0
Paraformaldehyd	30,03	3 %

pH 7,4 (eingestellt mit 1 M NaOH- bzw. HCl-Lösung)

Fixierlösung II

Substanz	MW	mmol/l
NaCl	58,440	90,0
K ₂ HPO ₄	174,180	15,0
EGTA	380,400	1,0
MgCl ₂	203,300	2,0
Saccharose	342,300	17 %
Paraformaldehyd		1 %

pH 7,4 (eingestellt mit 1 M NaOH- bzw. HCl-Lösung)

Tailbuffer

Substanz	Menge
EDTA	0,1 M
SDS	0,5 %
Tris-HCl	50 mM
Milli-Q	ad 50 ml

pH 8,0 (eingestellt mit 1 M NaOH -Lösung)

Mastermix I (Genotypisierungs-PCR)

Substanz	µl
Red Taq Ready Mix	10,0
Primer 1 (WT bzw. KO sense; 10µM)	1,0
Primer 2 (WT bzw. KO antisense; 10 µM)	1,0
Nuclease-freies H ₂ O	7,0
MM pro Reaktion	19,0

Mastermix II (Real-Time-PCR)

Substanz	µl
SYBR green PCR Mix	5,00
Primer 1 (10 µM)	0,25
Primer 2 (10 µM)	0,25
Nuclease-freies H ₂ O	3,50
MM pro Reaktion	9,00

Mastermix III (cDNA-Synthese)

Substanz	µl
M-MLV RT 5x Puffer	5,00
dNTPs (10 µM)	1,25
RNAse Inhibitor	1,00
Nuclease-freies H ₂ O	2,75
MM pro Reaktion	10,0

3.1.11 Antikörper

Antikörper	Art	Verd.	Hersteller
Anti KCNJ10 (rabbit)	Primär-AK	1:400	Alomone labs, Jerusalem, IL
Anti KCNJ16 (rabbit)	Primär-AK	1:400	Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg, D
Anti AQP2 (goat)	Primär-AK	1:500	Alomone labs, Jerusalem, IL
Alexa Fluor [®] 488 donkey anti rabbit	Sekundär-AK	1:400	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Alexa Fluor [®] 488 goat anti rabbit	Sekundär-AK	1:400	Life Technologies Ltd., Paisley, UK
HOE33342 (5 µM)	-	1:400	Life Technologies Ltd., Paisley, UK

3.1.12 Software

Software	Hersteller
AxioVision V4.7.20	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D
bio.exe	U. Fröbe, Freiburg, D
Intas GDS	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D
LabChart 6 V 6.1.1	A&D Instruments Ltd., Abingdon, U.K
LightCycler 480 Software	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Magellan	Tecan Group AG, Männedorf, CH
MetaMorph v6.2r2	Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA
NanoDrop 2000/2000c V1.3.1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NanoDrop 3300 V2.7.0	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Patch-Master v4.7.20	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, D

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Um die Bedeutung der Kir-Kanaluntereinheit KCNJ16 näher zu untersuchen, wurde eine KCNJ16-Knockoutmaus (KCNJ16^{-/-}) als Modellorganismus verwendet. Das Mausmodell (Nr. TF0347) wurde von der Firma Lexicon/Taconic in einem Mäusestamm mit gemischtem 129/SvEv-C57BL/6 Background generiert. Als Vergleichsgruppe wurde eine Wildtyp-Mauslinie verwendet (KCNJ16^{+/+}), die aus Verpaarungen heterozygoter KCNJ16-Mäuse hervorging. Es wurden stets nur entweder Wildtyp-Mäuse oder Knockout-Mäuse untereinander verpaart. Heterozygoten-Verpaarungen wären zwar der Idealfall, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit von Wildtyp- und Knockouttieren zu erreichen. Dabei hätten sich jedoch statistisch gesehen in jedem Wurf 50 % heterozygote Tiere befunden, die nicht für Versuche benötigt worden wären. Um die Anzahl an nicht benötigten Tieren so gering wie möglich zu halten, wurden daher stets getrennte Wildtyp- und Knockoutzuchten angesetzt. Für die Versuche wurden (sofern nicht anders angegeben) immer Tiere beiderlei Geschlechts verwendet und es wurden nach Möglichkeit gleich alte Tiere verwendet. Alle Versuchstiere wurden nach dem geltenden Tierschutzgesetz in einem konventionellen Tierstall gehalten. Die Mäuse hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten speziesspezifische Standarddiät sowie Leitungswasser *ad libitum*.

3.2.2 Zellkultur-Arbeiten

Alle Zellkultur-Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Dabei wurden nur sterile Lösungen und mit 70%igem Ethanol desinfizierte oder autoklavierte Geräte und Verbrauchsmaterialien verwendet.

3.2.2.1 Splitten von Zellen

Die laufenden Zelllinien wurden in kleinen Zellkulturflaschen kultiviert. Vor dem Splitten der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt. Um eventuell noch vorhandene Reste an Medium und tote Zellen zu entfernen, wurden die Zellen anschließend mit 5 ml DPBS gewaschen. Nach Absaugen des DPBS wurden die Zellen mit 1 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung für etwa 5 min im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen mit Hilfe einer 1000 µl Pipette möglichst vollständig vom Schalenboden abgelöst, suspendiert und in

4 ml Medium überführt. Um die Trypsin/EDTA-Lösung wieder entfernen zu können, wurden die Zellen anschließend für 3 min. bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 4 ml Medium resuspendiert. Dann wurden die Zellen auf frische Kulturschalen bzw. -flaschen ausgesät. Die Zellkulturflaschen zum Weiterführen der Zelllinien enthielten dabei stets 7 ml Medium, die kleinen Schalen 2 ml Medium sowie ein „gecoatetes“ Glasplättchen. Diese Glasplättchen wurden für einige Zeit in einem speziellen Coating-Medium im Brutschrank inkubiert. Das Coating-Medium enthielt die beiden Proteine Fibronectin und Collagen, die gemeinsam eine Matrix auf dem Glasplättchen ausbilden, welche den Zellen die Adhäsion an der glatten Glasoberfläche erleichtert.

3.2.2.2 Transfektion von HEK-Zellen mit Lipofectamine

Für die Transfektion mit Lipofectamine wurden die HEK-Zellen nach dem Splitten und Aussäen für mindestens eine Nacht im Brutschrank inkubiert und erst nach Erreichen von etwa 50 % Konfluenz transfiziert. Dazu wurden in zwei Tubes je 500 µl OptiMEM Medium pro Schälchen vorgelegt. In eines der Tubes wurde das Plasmid (i. d. R. 1 µg Plasmid pro Schale) und in das zweite Tube die benötigte Menge an Lipofectamine gegeben. Die entsprechende Lipofectamine-Menge (in µl) ergab sich dabei aus der verwendeten Plasmidmenge in µg mal zwei. Die beiden Ansätze wurden zunächst getrennt für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, dann wurden sie gemischt und es folgte eine weitere Inkubation für 20 min bei RT. Daraufhin wurden die zu transfizierenden Zellen mit 2 ml OptiMEM pro Schälchen gewaschen und mit je 1 ml des Transfektionsgemisches bedeckt. Das Transfektionsgemisch blieb für 3 Stunden auf den Zellen (bei 37 °C im Brutschrank). Danach wurde es abgesaugt und durch frisches HEK-Medium (2 ml pro Schale) ersetzt. Schließlich wurden die Zellen nochmals über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag für die Patch-Clamp Experimente eingesetzt.

3.2.2.3 Elektroporation von CHO-Zellen

Für die Transfektion von CHO-Zellen wurden 500.000 Zellen pro Schale (ausgezählt mit einer Neubauer-Zählkammer) mit 1 µg Plasmid elektroporiert (1.400 V, 20 ms, 2 Pulse) und in ein Schälchen mit gecoatetem Glasplättchen ausgesät. Die Elektroporation erfolgte nach Protokoll des Herstellers und wurde von Ines Tegtmeier durchgeführt.

3.2.2.4 Cotransfektion mit KCNJ10 und KCNJ16

Für die Cotransfektion der Zellen mit KCNJ10 und KCNJ16 Wildtyp bzw. KCNJ16 R137C wurde ein Verhältnis von 1:10 (also ein Teil KCNJ10 und neun Teile KCNJ16 Wildtyp bzw. R137C) gewählt. Diese Stöchiometrie wurde verwendet, um eine Bildung von KCNJ10 Homomeren bestmöglich zu vermeiden [31, 70].

3.2.3 Histologische Methoden

3.2.3.1 Retrograde arterielle Perfusion von Mäusen

Für Organentnahmen zur RNA-Isolation oder zur Anfertigung von Gewebeschnitten wurden die Mäuse retrograd über die *Aorta abdominalis* (Bauchaorta) perfundiert. Dazu wurden die Mäuse zunächst mit 2 bis 2,5 % Isofluran in einem Gasgemisch aus 50 % Sauerstoff und 50 % Stickstoff (Flussgeschwindigkeit 60 ml/min) narkotisiert. Dann wurden die Mäuse in Rückenlage auf einer beheizten Unterlage (37 °C) mit Gewebeband fixiert. Der abdominale Bereich wurde mit Paraffin benetzt, um lose Mäusehaare beim Aufschneiden des Fells zu vermeiden. Diese stören zum einen bei der Präparation und können zum anderen Gewebeproben, die zur RNA-Isolation verwendet werden, verunreinigen. Nach Öffnen des Abdomens wurden die *Aorta abdominalis* und die *Vena cava inferior* freipräpariert und ein dünner Katheter in die zuvor kranial der Schnittstelle abgeklemmte Bauchaorta eingeführt. Damit das Perfusat abfließen konnte, wurde vor Beginn der Perfusion die *Vena cava inferior* mit einem Schnitt geöffnet. Nach Entfernen der Aortenklemme wurden die Mäuse zunächst mit 10 ml einer heparinisierten isotonen NaCl-Lösung (0,9 %) über eine Rollerpumpe perfundiert, um das Blut aus dem Organismus zu entfernen und eine eventuelle Blutgerinnung zu verhindern. Sollten die Organe der RNA-Gewinnung dienen, wurden sie im Anschluss zügig entfernt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die Organentnahme zur Anfertigung von Gewebeschnitten erfolgte im Anschluss an die Perfusion mit heparinisiertem NaCl eine Perfusion mit 20 ml Fixierlösung I. Zum Schutz vor Gefrierschäden wurden die Organe daraufhin noch mit 10 ml Fixierlösung II perfundiert und nach Entnahme noch für ca. 15 min in dieser Lösung nachfixiert. Die in der Fixierlösung II enthaltene Saccharose erniedrigt den Gefrierpunkt und ermöglicht dadurch ein gewebeschonendes Einfrieren.

3.2.3.2 Vorbereitung und Anfertigung von Gewebeschnitten

Die fixierten Organe wurden schrittweise in 2-Methylbutan eingefroren, um ein Zerbrechen des Gewebes bei zu schnellem Einfrieren zu verhindern. Dazu wurde das 2-Methylbutan in einem kleinen Becherglas mit Hilfe von flüssigem Stickstoff zunächst auf ca. -20 °C gekühlt, dann wurden die Organe hinzugegeben und unter Rühren eingefroren. Daraufhin wurde das Gefäß stufenweise auf ca. -40 °C und schließlich auf etwa -70 °C gekühlt. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert. Für die Anfertigung von Gewebeschnitten wurden die Organe mit Hilfe von Tissue Tek Einbettmedium auf dem Gewebeträger des Kryostaten fixiert. Es wurden Gewebeschnitte von 5 bis 7 µm Dicke angefertigt und auf Polysin Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden bei -20 °C bis zur Färbung gelagert.

3.2.3.3 Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten

Die gefrorenen Schnitte wurden zunächst für ein paar Minuten bei RT aufgetaut. Dann wurden sie für 5 min mit PBS in einer Färbeküvette gewaschen. Zur Epitop-Demaskierung folgte ein 5-minütiges Bad in einer PBS Lösung, die 0,1 % SDS enthielt. Die Objektträger wurden erneut mit PBS gewaschen und im Anschluss kurz getrocknet. Daraufhin wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet, um ein Verlaufen der folgenden Färbelösungen zu verhindern. Dann wurden die Schnitte für 10 min mit einer 5 % BSA + 0,04 % Triton X-100 Lösung (in PBS) behandelt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren (sog. „blocken“). Das Triton X-100 dient der Permeabilisierung der Zellmembran und erleichtert damit den Eintritt von BSA in die Zelle. Die Block-Lösung wurde wiederum mit PBS gewegewaschen. Dann erfolgte die Inkubation der Schnitte mit der jeweiligen Primär-Antikörper-Lösung (verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen siehe 3.1.11) über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen, bevor sie für 1 h mit der Sekundär-Antikörper-Lösung bei RT im Dunkeln inkubiert wurden. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte mit Hilfe eines fluoreszenzfreien Mounting Mediums eingedeckelt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.2.3.4 Immunhistochemische Färbung von transfizierten Zellen

Wenn ein mutierter Kanal in Patch-Clamp Experimenten eine verringerte bzw. keine Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Kanal zeigt, kann dies zwei Gründe haben: Entweder führt die Mutation aufgrund veränderter biophysikalischer Eigenschaften zu einer verringerten Leitfähigkeit bzw. Offenwahrscheinlichkeit oder die Membranexpression ist vermindert. Um letzteres zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen an transfizierten CHO-Zellen vorgenommen. Dafür wurden CHO-Zellen zunächst mit dem jeweiligen Plasmid elektroporiert (siehe oben) und am nächsten Tag für 7 min mit Fixierlösung I (3 % PFA) fixiert. Dann wurden die Zellen mit PBS für ca. 5 min gewaschen. Als nächstes wurde der primäre Antikörper (gelöst in PBS + 0,04 % Triton X-100) für etwa eine Stunde auf die Zellen gegeben. Bevor der sekundäre Antikörper (gelöst in PBS + 0,04 % Triton X-100) auf die Zellen pipettiert wurde, wurden diese wiederum mit PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper blieb für eine Stunde im Dunkeln auf den Zellen. Danach wurden die Zellen ein letztes Mal mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurde das Deckgläschen mit Hilfe von Mounting-Medium mit der bewachsenen Seite nach unten auf einem Objektträger fixiert. Die jeweils verwendeten Verdünnungen der Antikörper ist in der Tabelle unter Punkt 3.1.11 angegeben. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Mikroskop der Firma Zeiss gemacht.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Für die Isolierung genomischer DNA wurden den Mäusen Schwanzbiopsien von ca. 3 bis 5 mm Länge entnommen. Diese wurden über Nacht bei 55 °C in je 300 µl Tailbuffer und 1 µl Proteinase K Lösung (100 mg/ml) im Thermomixer inkubiert. Dann wurde der Verdau bei 6000 rpm für 3 min abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Cup überführt. Dem Überstand wurden 100 µl NH₄-Acetat zugefügt und der Ansatz wurde mehrfach invertiert, bevor 600 µl Isopropanol hinzugegeben wurden. Der Ansatz wurde wiederum mehrfach invertiert und dann für die DNA-Fällung für 20 min in einen -20 °C Gefrierschrank gestellt. Dann wurde die DNA für 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde daraufhin mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Ethanol wurde

abpipettiert und das Pellet wurde für 10 min bei RT getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 80 bis 100 µl TE für ca. 3 h im Thermomixer resuspendiert.

3.2.4.2 Isolierung von Total-RNA aus Organen

Für die Entnahme von Organen zur RNA-Isolierung wurden die mit Isofluran narkotisierten Mäuse retrograd über die Bauchorta mit heparinisierter 0,9 %iger NaCl-Lösung perfundiert (vgl. 3.2.3.1). Die entnommenen Organe wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff sofort eingefroren und bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C aufbewahrt. Größere Organe wie die Nieren wurden zunächst in noch gefrorenem Zustand mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Die Schilddrüsen wurden aufgrund ihrer geringen Größe direkt in ein Eppendorf-Cup, das einen Lysepuffer enthielt, gegeben und darin mit einem kleinen Plastikpistill zerrieben. Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der gewonnenen Total-RNA wurde daraufhin mit Hilfe des Spectrophotometers Nanodrop 3000 bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.4.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die cDNA-Synthese wurde jeweils 1 µg Total-RNA eingesetzt, welche mit Nuclease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14 µl gebracht wurde. Dann wurde 1 µl Random Hexamer Primer (100 µM) zugegeben und der Ansatz für 5 min bei 70 °C inkubiert, bevor er für 5 min auf Eis gekühlt wurde. Dann wurde dem Reaktionsgemisch 10 µl Mastermix III zugegeben (vgl. Abschnitt 3.1.10), so dass das Volumen des gesamten Ansatzes schließlich 25 µl betrug. Davon wurden 4 µl als Negativkontrolle (ohne Reverse Transkriptase = -RT-Ansatz) verwendet. Den übrigen 21 µl wurden 0,84 µl M-MLV RT zugesetzt (+RT-Ansatz). Beide Ansätze wurden dann für die eigentliche cDNA-Synthese in einen Thermocycler gegeben (PCR-Protokoll siehe Abschnitt 3.1.7). Bis zur Verwendung für die Real-Time PCR wurde die cDNA bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.4.4 Qualitative und quantitative PCR

Qualitative PCR

Für die Genotypisierung der Mäuse mittels qualitativer PCR wurde jeweils 1 µl genomische DNA, die aus Schwanzbiopsien isoliert wurde, eingesetzt. Bei Bedarf wurde die genomische DNA zuvor 1:5 oder 1:10 mit Nuclease-freiem Wasser verdünnt. Für Wildtyp- und Knockout-Primer wurden zwei getrennte Mastermix-Ansätze hergestellt (siehe Abschnitt 3.1.10). Die DNA-Amplifikation erfolgte mittels einer Stufen-PCR (Programm siehe 3.1.7). Anschließend wurde die DNA auf ein 3%iges Agarose-Gel (3 % Agarose in TAE-Puffer) aufgetragen und bei 100 V für ca. 40 min mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Als Standard wurde eine 50 bp DNA-Ladder verwendet. Die Größe des Wildtyp-Amplikons lag bei 265 bp, die des Knockout-Amplikons bei 316 bp.

Quantitative PCR

Bei der quantitativen PCR wird die amplifizierte DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus photometrisch vermessen. Dadurch kann der Verlauf der Reaktion in Echtzeit („real time“) verfolgt werden. Für diese Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green für die Real-Time PCR verwendet. Dieser bindet mit hoher Affinität an doppelsträngige DNA, wobei gebundenes SYBR® Green um ein vielfaches stärker fluoresziert als ungebundenes. Die Signalintensität ist proportional zur entstehenden DNA-Menge.

Für den PCR-Ansatz wurde das SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Pro Reaktion wurden 9 µl Mastermix II (vgl. 3.1.10) und 1 µl cDNA eingesetzt. Für die Real-Time PCR wurden i. d. R. intron-spanning Primer verwendet, um die Amplifikation genomischer DNA auszuschließen. Das verwendete PCR-Protokoll ist im Abschnitt 3.1.7 aufgeführt. Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der synthetisierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam von 59 °C auf 97 °C erhitzt. Während des Aufschmelzens wurde die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Anhand der daraus erstellten Schmelzkurven und der Kontrolle der PCR-Produkte auf einem 3%igen Agarose-Gel konnte die Spezifität der amplifizierten DNA überprüft werden. Bei der Auswertung der Real-Time Daten wurde die gemessene DNA-Menge des Zielgens auf die DNA-Menge von β-Actin normalisiert. Bei β-Actin handelt es sich um ein sog. Haushaltsgen (engl.

housekeeping gene), das konstitutiv und weitgehend unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird. Durch diese Normalisierung versucht man, Schwankungen in der Konzentration der eingesetzten cDNA-Menge auszugleichen, die durch unterschiedliche Effizienzen der cDNA-Synthese bedingt sein können.

3.2.4.5 Transformation von kompetenten XL1-Blue Zellen

Für die Vervielfältigung von Plasmiden wurden kompetente XL1-Blue Zellen verwendet. Um die Plasmide in die Bakterien einzubringen (Transformation), wurden zunächst 50 µl einer XL1-Blue Zellsuspension mit 1 µl Plasmid-DNA versetzt. Dann wurden die Zellen für 15 bis 30 min auf Eis inkubiert, bevor sie für 30 sec bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt wurden. Danach wurden die Zellen wieder auf Eis abgekühlt, mit 700 µl LB-Medium versetzt und bei 37 °C für 30 min im Thermomixer inkubiert. Dann wurden 50 µl der Bakteriensuspension auf einer vorgewärmten LB-Amp-Platte ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.2.4.6 Mini- und Midi-Präparation (Plasmidisolierung)

Für die Vervielfältigung der Plasmide wurden zunächst einzelne Klone von den LB-Amp-Platten gepickt und in flüssiges LB-Medium (versetzt mit 1 µl/ml Ampicillin-Lösung) überführt. Die Bakteriensuspension wurde über Nacht in einem Wärmeschüttler inkubiert und am nächsten Tag für die Plasmidisolierung verwendet. Für die Mini-Präparation kleinerer Plasmidmengen wurde das „NucleoSpin Plasmid“-Kit und für die Midi-Präparation größerer Plasmidmengen das „NucleoBond Extra Midi“-Kit (beides von Machery-Nagel) verwendet. Die Isolierung erfolgte jeweils nach Herstellerprotokoll.

3.2.4.7 Site-directed Mutagenesis

Um die Auswirkung der KCNJ16 Mutation R137C auf elektrophysiologischer Ebene untersuchen zu können, musste die Mutation zunächst mittels zielgerichteter Mutagenese (engl. „Site-directed Mutagenesis“) in das humane Wildtyp KCNJ16-Gen eingebracht werden. Dafür wurde 1 µl KCNJ16 pIRES CD8 Plasmid (0,1 µg/µl) mit 2,5 µl Advantage 10x Puffer, 2 µl dNTPs (10 µM), 1 µl Advantage Polymerase und je 1 µl Primer (vgl. 3.1.6) versetzt und mit Nuklease-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Mit Hilfe der PCR-Technik wurde aus diesem Ansatz ein pIRES CD8 Plasmid generiert, das das mutierte

KCNJ16-Gen enthielt (Programm siehe 3.1.7). Über einen DpnI-Verdau wurde methylierte DNA aus dem Ansatz abgebaut und damit diejenigen Plasmide entfernt, die das Wildtyp-Gen enthielten. Mittels Transformation wurden die verbleibenden Plasmide in kompetente XL1-blue Bakterien eingebracht und vermehrt. Nach einem analytischen Verdau mehrerer Klone erfolgte die Sequenzierung der Inserts durch die Firma SeqLab. Einer der Klone, der ein Plasmid mit der gewünschten Mutation enthielt, wurde dann für die Transfektion von Zellen verwendet.

3.2.5 Analyse von Blut- und Urinproben

3.2.5.1 Probengewinnung

Die Blutproben von Mäusen wurden je nach Versuch und benötigtem Probenvolumen entweder über den retrobulbären oder den bukkalen Venenplexus oder aus der Schwanzspitze entnommen. Im Falle von letalen Versuchen erfolgte zum Teil auch eine Blutabnahme über die *Aorta abdominalis*. Für die Urinmessungen wurde größtenteils Spontanurin verwendet. Bei neugeborenen Mäusen wurde dieser über leichten Druck auf die Blase gewonnen und konnte direkt mit einer Pipette aufgenommen werden. Adulte Tiere entleerten ihre Blase meist spontan nach Herausnahme aus dem Käfig, so dass der Urin auf der zuvor mit Ethanol gereinigten Tischplatte gesammelt und von dort in ein Eppendorf-Cup transferiert werden konnte. Im Laufe der GFR-Messungen wurden Urinproben über Punktion der Blase gewonnen. Diese Urinproben wurden außer für die Bestimmung der Inulin-Clearance auch für Elektrolytmessungen verwendet.

3.2.5.2 Aldosteron-ELISA

Für die Bestimmung der Aldosteron-Konzentration im Plasma von KCNJ16 Mäusen wurde der Aldosteron-ELISA von IBL verwendet. Das Plasma wurde durch letale Blutabnahme über die Bauchorta gewonnen und der ELISA nach Protokoll des Herstellers von Philipp Tauber durchgeführt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Photometers von TECAN Sunrise bei 450 nm.

3.2.5.3 Ionenchromatographie

Für die Messung zahlreicher Ionen in Urin- und Blutproben von Mäusen wurde der Ionenchromatograph Dionex ICS-1600 (Thermo Scientific) verwendet. Die Aufbereitung und Vermessung der Proben erfolgte durch Ines Tegtmeier nach Angaben des Herstellers.

3.2.5.4 Blutgasanalyse und Elektrolytmessungen

KCNJ16 ist an der chemosensorischen Kontrolle der Atmung beteiligt und ein Knockout von KCNJ16 könnte daher zu veränderten Blutgaswerten führen [94]. Zur Messung der Blutgase wurde den anästhesierten Mäusen Blut letal über die Bauchorta entnommen. Dazu wurde den Mäusen ein kurzer Katheter in die zuvor kranial zur Schnittstelle abgeklemmte *Aorta abdominalis* eingeführt. Um das Blut luftblasenfrei abzunehmen, wurde eine heparinisierte Kapillare direkt an den Katheter gehalten bevor die Klemme gelöst wurde. Das abgenommene Blut wurde unverzüglich am Blutgasanalysegerät pHox plusM (Nova biomedical) vermessen, um eine Verfälschung der Blutgaswerte durch den Sauerstoff in der Raumluft möglichst auszuschließen. Das verwendete Gerät misst neben den Blutgasen auch Na^+ -, K^+ -, Mg^{2+} -, Ca^{2+} -, HCO_3^- -, Hämatokrit- und pH-Wert sowie den Basenexzess. Da dieses Gerät jedoch keine Chlorid-Werte bestimmen kann, wurde ein Teil des entnommenen Blutes zudem mit dem AVL Electrolyte Analyzer (Roche) untersucht, der die Na^+ -, K^+ - und Cl^- -Konzentration misst. Das restliche Blut wurde abzentrifugiert, das Plasma abpipettiert und für weitere Messungen bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ im Gefrierschrank aufbewahrt.

3.2.6 Nicht-invasive Blutdruckmessungen am wachen Tier

Wie bereits erwähnt sind die Nieren wesentlich an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Daher wurde bei den KCNJ16-Mäusen der Blutdruck am wachen Tier mit Hilfe der Tail-Cuff Methode gemessen. Dazu wurde ein Blutdruckmesssystem der Firma TSE verwendet. Es wurden 6 Wildtyp- und 5 Knockoutmäuse untersucht, wobei ausschließlich Weibchen verwendet wurden. Um die Tiere an die Messprozedur zu gewöhnen, wurden dieselben Mäuse drei Wochen lang täglich (Mo bis Fr) gemessen. Nur die Messungen der dritten Woche wurden für die Auswertung verwendet. Vor Beginn der Messung wurden die Mäuse in eine kleine Kammer gesetzt, die eine Aussparung für den Schwanz besitzt. Über den Schwanz wurden die Manschette und der Messsensor gestreift, bevor er mit

Klebeband fixiert wurde. Mit der Messung wurde erst begonnen, wenn sich das Tier beruhigt hatte und der Messsensor ein klares Pulssignal messen konnte. Dann wurde der Messvorgang über die Software am Rechner gestartet. Die Blutdruckmessung wurde von der Software automatisch weitere vier Mal wiederholt, um aus den insgesamt fünf Messwerten am Ende einen Mittelwert zu errechnen. Die Blutdruckmessungen erfolgten in einer Wärmekammer (37 °C) in einer ruhigen Umgebung, um die Tiere nicht unnötigem Stress auszusetzen.

3.2.7 GFR-Messungen und Diuretika-Versuche

Die Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) von Mäusen erfolgte über die Messung der Inulin-Clearance am narkotisierten Tier. Die GFR ist definiert als das Plasmavolumen, das pro Zeiteinheit von beiden Nieren filtriert wird. Unter Clearance versteht man dasjenige Plasmavolumen, das in einer bestimmten Zeit von einer bestimmten Substanz vollständig befreit wird. Da Inulin frei filtrierbar ist und in den Nieren weder sezerniert noch rückresorbiert wird, entspricht die Inulin-Clearance in etwa der GFR.

Für die Messung der Inulin-Clearance wurden die Mäuse wie unter 3.2.3.1 beschrieben narkotisiert und fixiert. Das für die Bestimmung der Inulin-Clearance benötigte Blut wurde aus der Schwanzspitze gewonnen und in einer heparinisierten Hämatokrit-Kapillare gesammelt. Zur Gewinnung des Plasmas wurden die Kapillaren in einer Hämatokritzentrifuge für 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Nach Zerteilen der Kapillaren mit einem Glasschneider wurde das Plasma abpipettiert und für die weitere Verwendung bei -20°C gelagert. Die Gewinnung des Urins erfolgte durch Punktieren der Harnblase mit einer Insulin-Spritze. Dafür wurde zu Beginn des Experiments der untere Bauchraum mit einem kleinen Schnitt geöffnet. Damit die Wunde nicht austrocknet, wurde sie mit einem Stück Zellstoff bedeckt, das mit isotoner NaCl-Lösung feucht gehalten wurde. Nach der Abnahme wurde der Urin gewogen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Es wurde stets darauf geachtet, die Blase vollständig zu entleeren, da Resturin die Clearance-Messungen verfälscht hätte. Die Blut- und Urinabnahme erfolgte alle halbe Stunde und es wurde dabei immer mit der Urinabnahme begonnen.

Für die Infusion von Inulin-FITC (5 mg Inulin-FITC/ml isotone NaCl-Lösung) wurde in die *Vena femoralis* des linken Beins ein Katheter eingeführt und mit einer Ligatur fixiert. Auch diese Wunde wurde mit NaCl-durchtränktem Zellstoff bedeckt. Die Verwendung eines Perfusors sorgte für eine konstante Infusion der Inulin-FITC-Lösung. Zunächst wurde für eine Minute ein Bolus von 2 $\mu\text{l/g KG/min}$ angelegt, dann wurde die Perfusionsgeschwindigkeit auf 0,2 $\mu\text{l/g KG/min}$ reduziert. Die ersten 30 min des Experiments dienten als Äquilibratorphase (vgl. Schema in Abbildung 9), während der sich ein Gleichgewicht zwischen infundiertem und renal ausgeschiedenem Inulin-FITC einstellen sollte. Während dieser Phase wurde zudem ein Katheter in die *Arteria femoralis* des rechten Beins gelegt und mit einer Ligatur fixiert. Der Katheter war an ein Messsystem angeschlossen, das die Kontrolle des Blutdrucks während des Experiments ermöglichte. Die GFR ist nur in Bereichen von 80 bis 180 mmHg vom Blutdruck unabhängig, daher wurde darauf geachtet, dass der Blutdruck während des Experiments innerhalb dieser Grenzen blieb. Bei Bedarf wurde die Narkosetiefe verändert.

Im Anschluss an die Äquilibratorphase folgte eine 30-minütige Kontrollphase, in der die GFR unter Normalbedingungen gemessen wurde. Vor der folgenden 60-minütigen Testphase wurden die beiden Diuretika Hydrochlorothiazid (HCT) und Amilorid in den Abdominalraum appliziert. Dabei wurden 5 $\mu\text{g/g KG}$ Amilorid und 20 $\mu\text{g/g KG}$ HCT verwendet. HCT hemmt den NCC im distalen Tubulus. Ist die Na^+ und Cl^- Rückresorption durch den Knockout in irgendeiner Weise verändert, fällt auch die Reaktion auf HCT anders aus als bei Wildtypmäusen. HCT kann somit Transportdefekte im DCT besser sichtbar machen. Amilorid hingegen hemmt den epithelialen Natriumkanal (ENaC) im Sammelrohr und verhindert eine Kompensation des durch HCT bedingten NaCl-Verlustes in späteren Tubulusabschnitten. Das Experiment wurde durch Öffnen der Bauchaorta und Ausbluten des Versuchstieres beendet.

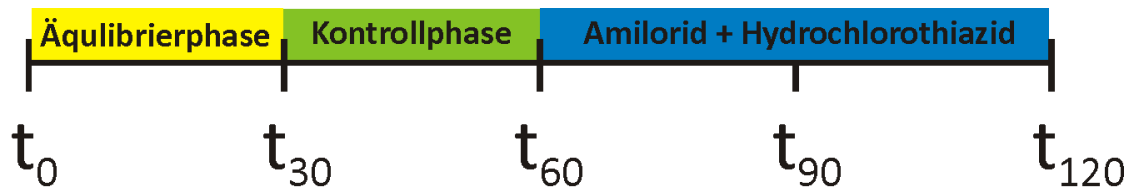


Abbildung 9: Schematischer Ablauf der GFR Experimente

Die ersten 30 min dienten als Äquilibrationphase, während der sich ein Gleichgewicht zwischen infundiertem und renal ausgeschiedenem Inulin-FITC einstellen sollte. Dann folgte eine 30-minütige Kontrollphase, in der die GFR unter Normalbedingungen bestimmt wurde. Im Anschluss erfolgte die Testphase, während der die Diuretika Amilorid und Hydrochlorothiazid appliziert wurden. Zu den Zeitpunkten t_{30} , t_{60} , t_{90} und t_{120} wurden jeweils Blut- und Urinproben für die Messung der Inulin- und der Elektrolytkonzentrationen entnommen.

3.2.8 Patch-Clamp Experimente

Die Patch-Clamp-Technik ist eine Methode in der Elektrophysiologie, die die Messung von Strömen durch (einzelne) Ionenkanäle einer Zelle ermöglicht [95]. Dabei handelt es sich um sehr kleine Ströme im Bereich von wenigen Picoampere (pA), wodurch eine sehr hohe Verstärkung des Messsignals nötig ist. Patch-Clamp Experimente können je nach Fragestellung in vier unterschiedlichen Konfigurationen durchgeführt werden, die in Abbildung 10 dargestellt sind. Für die vorliegende Arbeit wurden drei davon verwendet: Whole cell, Cell attached und Inside out. In der Whole cell Konfiguration ist das Messen des (Ruhe)membranpotentials der Zelle sowie des Stromflusses über die gesamte Zellmembran möglich. Dies erlaubt Analysen des makroskopischen Strommusters eines Kanals. Die Cell attached Konfiguration eignet sich besonders gut dazu, die Eigenschaften einzelner Ionenkanäle in ihrer physiologischen Umgebung zu untersuchen. Die Inside out Konfiguration ermöglicht es hingegen, die im herausgerissenen Membranfleck („patch“) vorhandenen Kanäle zellfrei zu vermessen. Da in dieser Konfiguration die Innenseite der Membran nach außen ins Bad zeigt, können hier Aktivatoren und Hemmstoffe des Kanals über die Badlösung appliziert werden, die von intrazellulärer Seite wirken.

Über die Software am Patch-Clamp Setup kann für die Messungen zwischen verschiedenen Messmodi gewechselt werden. Im Current-Clamp (CC) Modus wird der Strom auf einen festen Wert geklemmt (z. B. auf 0 pA im CC-zero Modus), so dass das Membranpotential der Zelle gemessen werden kann. Im Voltage-Clamp (VC) Modus wird

hingegen das Potential über die Zellmembran auf einen bestimmten Wert geklemmt, wodurch der resultierende Stromfluss gemessen werden kann. Über verschiedene Klemmspannungen (sog. Spannungstreppen) im VC-Modus kann damit unter anderem die Spannungsabhängigkeit eines Kanals untersucht werden.

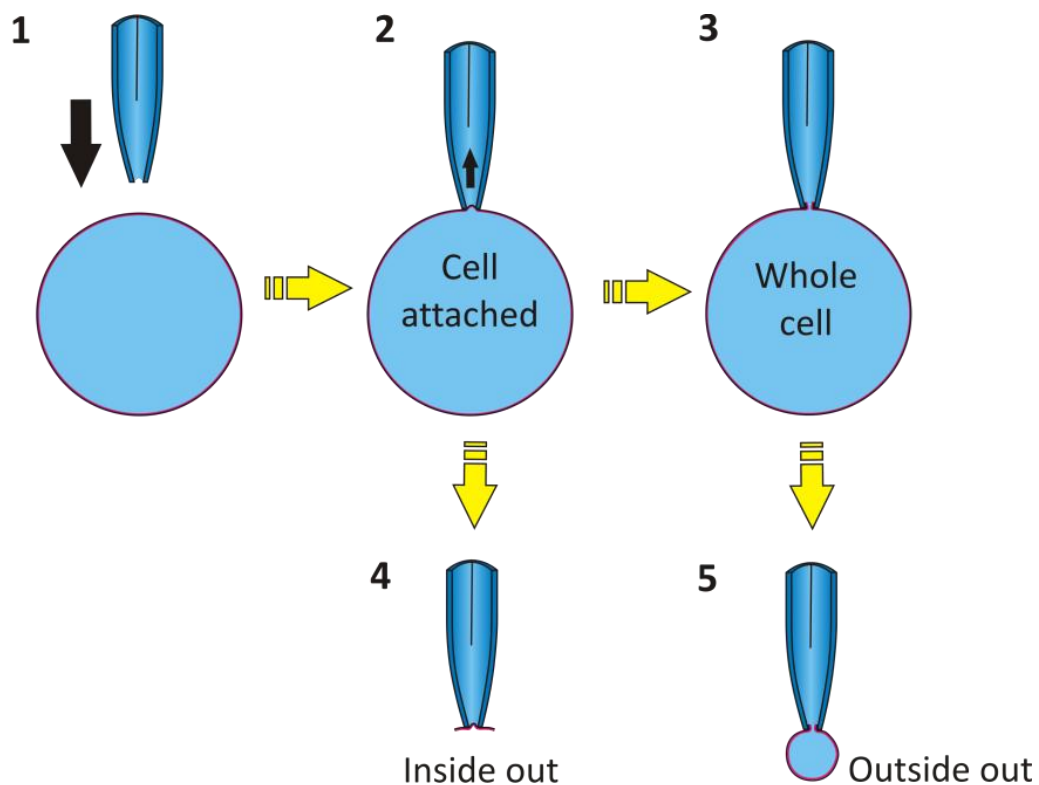


Abbildung 10: Die vier verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen

Zunächst nähert man sich mit der Patchpipette vorsichtig der Zelle (1) und setzt sie behutsam auf der Zellmembran auf. Über Anlegen eines leichten Unterdrucks an die Pipette erreicht man ein „Seal“ und befindet sich damit automatisch in der „Cell attached“ Konfiguration (2). Durch Erhöhung des Unterdrucks reißt die Membran unter der Pipette ein und man gelangt in die „Whole cell“ Konfiguration (3). Bewegt man die Pipette aus dieser Position langsam von der Zelle weg, erreicht man die „Outside out“ Konfiguration (5). Von der Cell attached Konfiguration aus kann man über das ruckartige Wegbewegen der Patchpipette nach oben einen kleinen Membranfleck („patch“) aus der Zellmembran herausreißen und befindet sich dann in der „Inside out“ Konfiguration (4).

3.2.8.1 Vorbereitung der Zellen für Patch-Clamp Experimente

Die für die Transfektion eingesetzten Plasmide enthielten alle zusätzlich zum eigentlichen Insert ein Gen, das für das Oberflächenprotein CD8 codiert. Somit exprimierten transfizierte Zellen nicht nur das jeweils gewünschte Zielprotein (z. B. KCNJ16 WT), sondern auch das CD8-Protein. Über DynaBeads, die mit Antikörpern gegen CD8 beschichtet sind, konnten unter dem Mikroskop transfizierte von untransfizierten Zellen unterschieden werden. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1 ml Ringerlösung gewaschen. Dann wurden 1 bis 1,5 μ l DynaBeads in 1 ml Ringerlösung suspendiert und auf die Zellen gegeben. Damit sich die DynaBeads besser verteilten, wurde das Kulturschälchen mit den Zellen für ca. 3 min auf einen Wipptisch gestellt. Im Anschluss wurde die DynaBead-Lösung wieder abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Ringer gewaschen, um ungebundene DynaBeads möglichst vollständig zu entfernen.

3.2.8.2 Whole cell Experimente

Die Experimente in der Whole cell Konfiguration erfolgten bei Raumtemperatur unter konstanter Perfusion mit Ringer-Lösung. Die verwendeten Patchpipetten hatten einen Widerstand von ca. 7 M Ω und wurden vor der Befestigung am Pipettenhalter mit Pipettenlösung 4 befüllt, deren Zusammensetzung im Wesentlichen der Zusammensetzung des Zytosols entspricht. Die zur Messung verwendeten Zellen wurden immer auf gecoateten Glasplättchen ausgesät. Die Ableitung in Whole cell Experimenten ist in Abbildung 11 als stark vereinfachtes Schaltbild dargestellt. Bei Whole cell Messungen ist es für korrekte Messergebnisse wichtig, dass der serielle Widerstand R_S (Widerstand zwischen Pipette und Zelle) nicht zu groß und der Membranwiderstand R_M nicht zu klein ist. Die angelegte Klemmspannung fällt nämlich über beide in Reihe geschalteten Widerstände ab, wobei der größere Teil der Spannung am größeren Widerstand abfällt. Nur wenn R_S im Vergleich zu R_M sehr klein ist, kann die Zellmembran auf die gewünschten Werte geklemmt werden. R_S kann z. B. durch Membranfragmente oder Organellen, die in die Patchpipette gesogen wurden, zu stark ansteigen. In solch einem Fall ist das Experiment abubrechen, wenn R_S einen Wert von ca. 100 M Ω überschreitet. R_M ist im Wesentlichen von der Anzahl der in der Zellmembran vorhandenen aktiven Kanäle abhängig. Daher kann R_M sehr klein werden, wenn die Zelle sehr viele aktive Kanäle mit hoher Leitfähigkeit (z. B. KCNJ10/KCNJ16 Heteromere) besitzt. Um dieses Problem zu

minimieren, wurden für die Whole cell Experimente CHO-Zellen verwendet, da diese im Vergleich zu HEK-Zellen weniger endogene Kanäle besitzen [96].

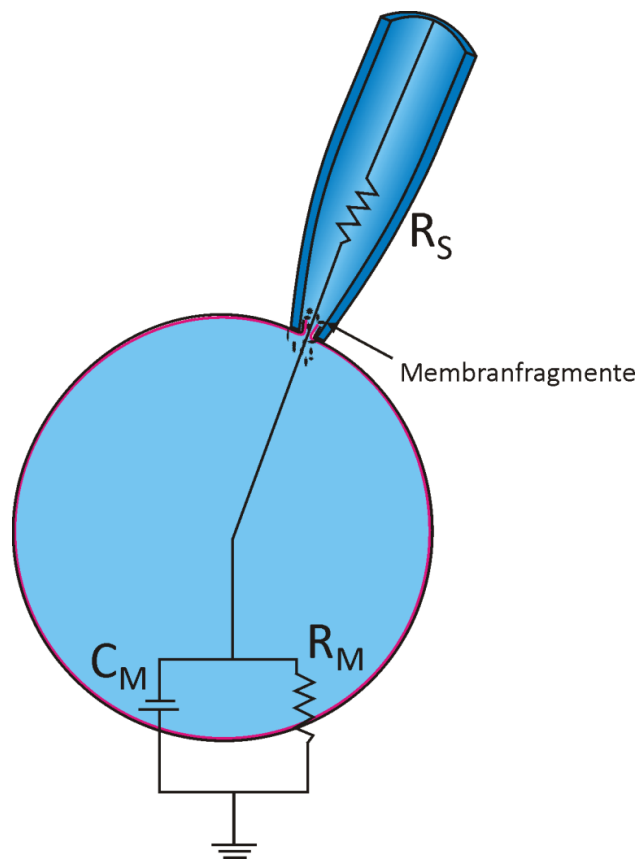


Abbildung 11: Vereinfachtes Schaltbild der Whole cell Ableitung

Die Zellmembran kann ähnlich wie ein Kondensator aufgeladen werden (C_M). Die Stromantwort auf die angelegte Klemmspannung hängt von den beiden in Reihe geschalteten Widerständen ab: Dem seriellen Widerstand (R_S) zwischen Pipette und Zelle, der mindestens so groß ist wie der Pipettenwiderstand und sich durch Membran- und Zellfragmente erhöhen kann, und dem Membranwiderstand (R_M), der von der Anzahl und Leitfähigkeit der aktiven Kanäle in der Zellmembran abhängt.

Für die Whole cell Messungen wurde ein EPC10-Verstärker von HEKA und die dazugehörige Software (PatchMaster) verwendet. Zunächst wurde eine vital aussehende Zelle gesucht, an die einige DynaBeads gebunden hatten. Dann wurde die Pipette vorsichtig auf die gewählte Zelle aufgesetzt und es wurde mit Hilfe einer Glasspritze ein leichter Unterdruck an die Pipette angelegt, bis sich ein sogenanntes Gigaohm-Seal ausbildete, d. h. der Widerstand zwischen Pipettenelektrode und Referenzelektrode auf über 1 GΩ angestiegen ist. Im CC-Zero-Modus wurde der Unterdruck unter Beobachtung des Membranpotentials so lange erhöht, bis die Zellmembran unter der Pipettenöffnung eingerissen ist und somit ein elektrischer Zugang zum Zellinneren entstand. Dann wurde

auf den Whole cell Modus gewechselt, wobei von der Software automatisch auch R_s und die Kapazität der Zellmembran (C_M), die von der Größe der Zelle abhängt, gemessen wurden. Wenn das Membranpotential einen stabilen Wert angenommen hatte und R_s nicht über 100 M Ω lag, wurde das Patch-Protokoll gestartet (andernfalls wurde das Experiment abgebrochen und eine neue Zelle gesucht). Durch das Starten des Patch-Protokolls wurden die Zellen im VC-Modus für jeweils zwei Sekunden in 30 mV Schritten von -120 mV bis +30 mV geklemmt (Spannungstreppe). Im Anschluss folgte für 10 Sekunden die Messung des Membranpotentials im CC-Zero-Modus (bei 0 A). Spannungstrecken und CC-Zero-Modus erfolgten stets im Wechsel. Nach drei bis vier Spannungstrecken wurde die Perfusion mit Ringerlösung gestoppt. Dann wurden etwa 5 ml einer 5 mM Ba^{2+} -Lösung über einen separaten Zulauf ins Patchbad gegeben. Nach einigen Spannungstrecken wurde die Badperfusion mit Ringerlösung wieder gestartet und der separate Ba^{2+} -Zulauf mit einigen ml Ringerlösung gespült, um das Ba^{2+} möglichst vollständig aus dem Bad und dem Zulauf auszuwaschen. Das Experiment wurde beendet, wenn das Membranpotential und die Stromantwort der Zelle wieder nahezu ihre Ausgangswerte erreicht hatten.

3.2.8.3 Single channel Experimente

Die Experimente in der Single channel Konfiguration erfolgten ebenfalls bei Raumtemperatur und zunächst unter konstanter Badperfusion mit Ringer. Für die Einzelkanalmessungen wurden jedoch HEK-Zellen (ausgesät auf geccoateten Glasplättchen) verwendet, da sich HEK-Zellen erfahrungsgemäß leichter patchen lassen als CHO-Zellen und Single channel Experimente in ihrer Durchführung aufwändiger sind als Whole cell Messungen. Mit HEK-Zellen ist die Chance auf ein erfolgreiches Experiment höher als mit CHO-Zellen. HEK-Zellen enthalten zwar mehr endogene (Kalium-)Kanäle als CHO-Zellen, doch diese stören bei Single channel Messungen nicht so sehr wie bei Whole cell Messungen. Denn die Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich in dem kleinen Patch unter der Pipette ein endogener Kanal befindet, ist relativ gering.

Der prinzipielle Ablauf zum Erreichen eines Seals entspricht dem Vorgehen bei Whole cell Messungen. Zum Anlegen von Klemmspannungen am Single channel Setup wurde eine selbstgeschriebene Software (U. Fröbe, Freiburg) und ein selbstgebauter EPC7-ähnlicher

Verstärker (U. Fröbe und R. Busche, Freiburg) verwendet. Nach Erzeugung eines Gigaohm-Seals wurden im Cell attached Modus verschiedene Klemmspannungen in 10 mV Schritten angelegt. Falls aktive Kanäle im Patch zu sehen waren, wurde dieser „exzidiert“ (also durch schnelles Wegbewegen der Pipette aus der Zellmembran herausgerissen) und im nun erreichten Inside out Modus weiter untersucht. Um symmetrische Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten des Patches zu erreichen, wurde die Badperfusion mit Ringerlösung gestoppt und stattdessen Pipettenlösung 4, die sich auch in der Patchpipette befand, ins Bad gegeben. Wenn auf beiden Seiten der Zellmembran die gleiche K^+ -Konzentration vorliegt, ist die angelegte Klemmspannung die einzige Triebkraft für den Kaliumstrom. So lässt sich die Abhängigkeit des Kaliumkanals von der angelegten Spannung leichter untersuchen. Zur Bestimmung der pH-Sensitivität des Kanals wurde bei gleichbleibender Klemmspannung schrittweise Pipettenlösung 4 mit unterschiedlichen pH-Werten (8,0; 7,2; 6,5; 6,0; 5,5) über einen separaten Badzulauf zugegeben. Nach Durchlaufen der pH-Reihe wurde wieder Pipettenlösung 4 mit pH 7.2 zugegeben, um die Reversibilität des pH-Effektes zu überprüfen. Am Ende des Experimentes wurde zudem meist noch 5 mM Ba^{2+} (in Pipettenlösung 4 gelöst) zugegeben. Ba^{2+} ist wie schon erwähnt ein sehr guter Hemmstoff von Kaliumkanälen, daher kann man über Zugabe von Ba^{2+} die Anwesenheit der exprimierten Kaliumkanäle im Patch nachweisen.

3.2.9 Statistik

Von allen Ergebnissen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) errechnet. Manchmal ist in den Abbildungen aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit der SEM nur in eine Richtung dargestellt. Die Signifikanzberechnungen zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Student's unpaired t-test durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet und in den jeweiligen Graphen mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Expression von KCNJ16

4.1.1 Gewebeverteilung von KCNJ16

Für das Verständnis der physiologischen Bedeutung von KCNJ16 ist es zunächst wichtig zu wissen, in welchen Geweben die Kanaluntereinheit in relevanter Menge exprimiert wird. Da die Expression eines Proteins Spezies- und Stamm-abhängig ist, wurde die KCNJ16-Expression in den von uns verwendeten KCNJ16^{+/+} Kontrollmäusen untersucht. Dazu wurde RNA aus unterschiedlichen Geweben isoliert und daraus cDNA synthetisiert, die dann für Real-Time PCR Experimente verwendet wurde. Für die RNA-Isolation wurden gezielt Organe ausgewählt, die beim Menschen bzw. bei der Maus laut dem EST-Profil der UniGene-Datenbank eine hohe KCNJ16-Expression zeigen.³

In Abbildung 12 ist die auf β -Aktin normalisierte Expression von KCNJ16 in verschiedenen Geweben von KCNJ16^{+/+} Mäusen zu sehen. In allen vier untersuchten Organen ist mRNA von KCNJ16 nachweisbar. In der Niere ist die Expression besonders hoch, doch auch in Schilddrüse, Magen und Gehirn war eindeutig KCNJ16 mRNA nachweisbar.

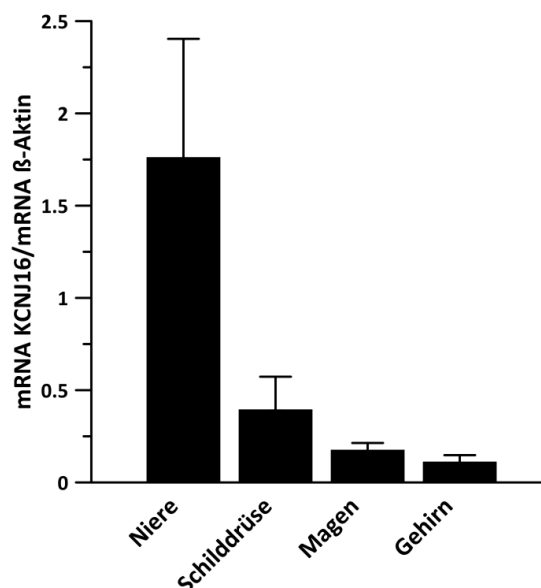


Abbildung 12: Expression von KCNJ16 in verschiedenen Geweben von Wildtypmäusen

In den untersuchten Geweben war die Expression von KCNJ16 mRNA bei KCNJ16^{+/+} Mäusen in der Niere am stärksten. In Schilddrüse, Magen und Gehirn wird die Untereinheit in geringeren Mengen gebildet.

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/uniGene/?term=kcnj16>

4.1.2 Lokalisation von KCNJ16 in der Niere

In dieser Arbeit lag der Fokus auf dem renalen Phänotyp der $KCNJ16^{-/-}$ Mäuse. Daher war es von besonderem Interesse, in welchen Tubulussegmenten der Niere die KCNJ16-Untereinheit lokalisiert ist. Dazu wurden Kryoschnitte von Mäusenieren immunhistochemisch mit verschiedenen Antikörpern angefärbt. Abbildung 13 zeigt die Übersichtsaufnahme einer Niere, bei der KCNJ16 und Aquaporin 2 (AQP2) angefärbt wurden. AQP2 wird bekanntermaßen nur in der apikalen Membran von Hauptzellen des CNT und des Sammelrohrs exprimiert und dient daher als selektiver Marker für diese Tubulusabschnitte, in denen laut Literatur auch KCNJ16 exprimiert wird [68]. Eine Färbung von KCNJ16 ist in den Übersichtsaufnahmen praktisch nur in Tubulusabschnitten der Nierenrinde zu sehen.

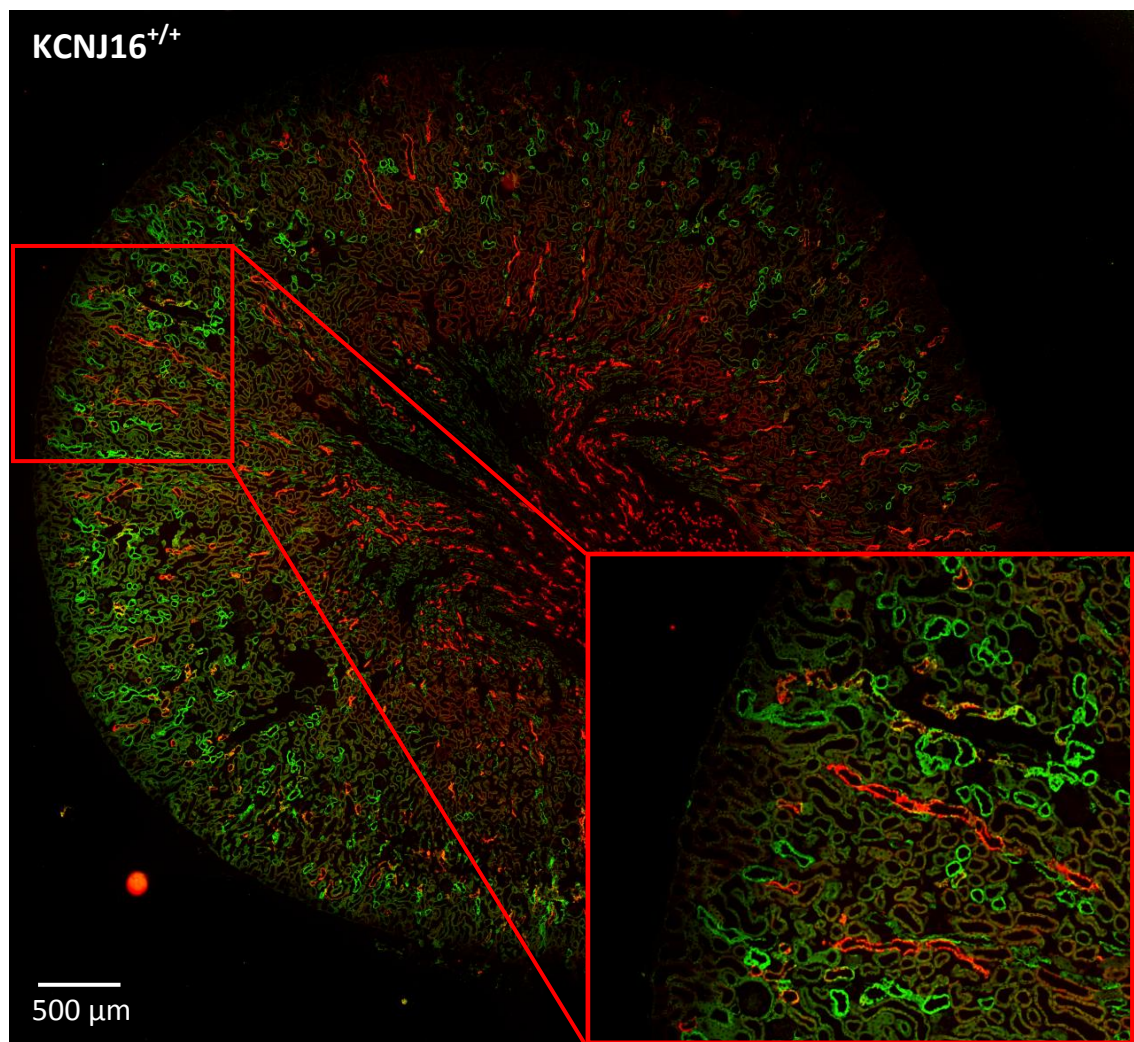


Abbildung 13: Übersichtsaufnahme der Niere einer $KCNJ16^{+/+}$ Maus

Eine Färbung von KCNJ16 (grün) ist nur in Tubulussegmenten des Nierenkortex zu sehen. AQP2 (rot) färbt die Hauptzellen des CNT und des Sammelrohrs in Nierenrinde und -mark.

Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen und zeitgleich den Knockout der KCNJ16 Untereinheit in den $KCNJ16^{-/-}$ Mäusen nachzuweisen, wurden Nieren von $KCNJ16^{-/-}$ Mäusen auf dieselbe Weise gefärbt wie die Nieren der $KCNJ16^{+/+}$ Mäuse (Abbildung 14). In den Nieren der $KCNJ16^{-/-}$ Mäuse war keine Färbung von KCNJ16 zu erkennen.

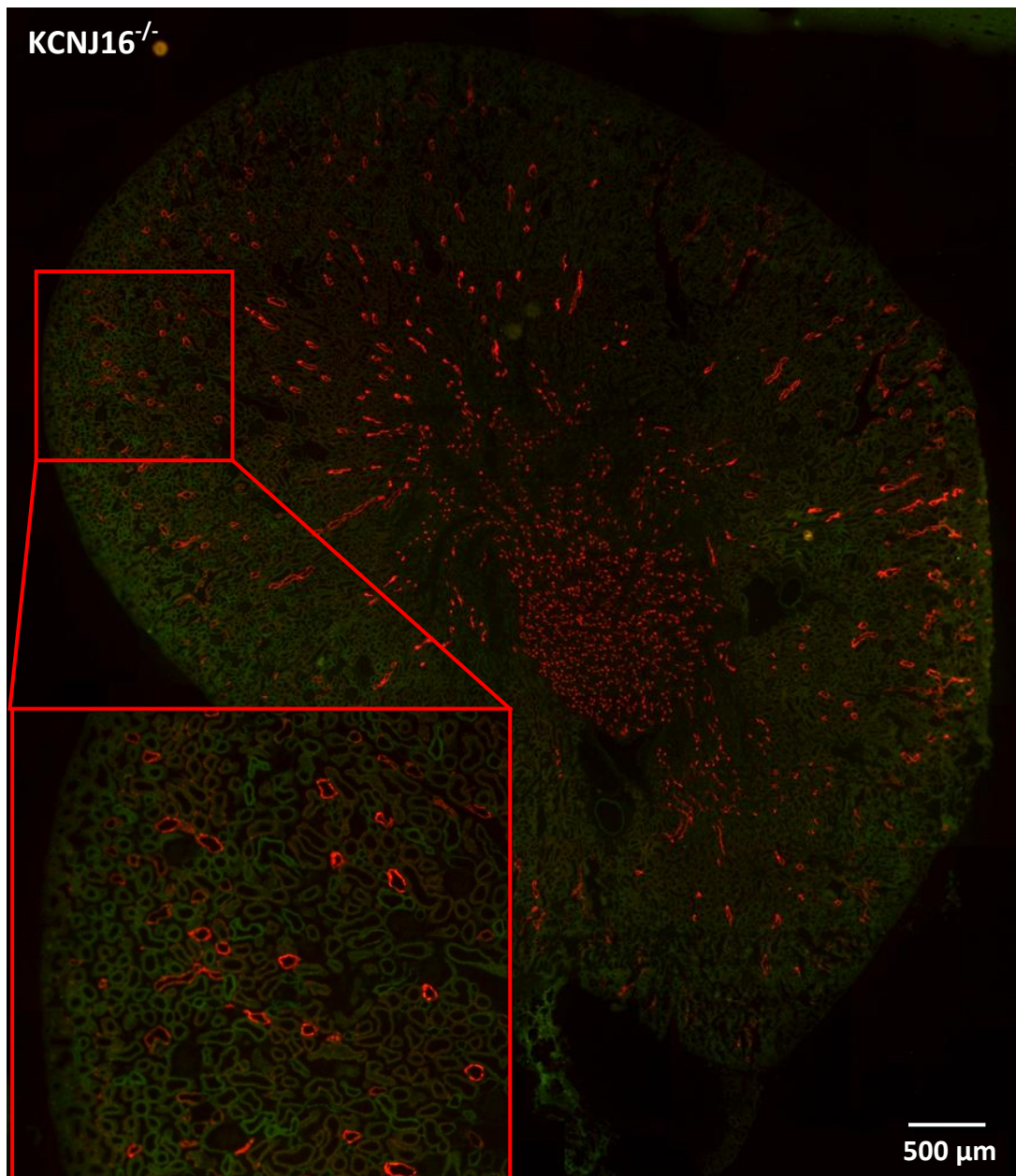


Abbildung 14: Übersichtsaufnahme der Niere einer $KCNJ16^{-/-}$ Maus

Grün: KCNJ16, Rot: AQP2; Bei $KCNJ16^{-/-}$ Mäusen ist keine spezifische Färbung von KCNJ16 (grün) in der Niere zu sehen. Es ist nur ein leichtes Hintergrundsignal zu erkennen. Die AQP2 Expression (rot) in $KCNJ16^{-/-}$ Mäusen ist gegenüber den $KCNJ16^{+/+}$ Mäusen unverändert.

In vorausgehenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden bereits Kofärbungen von KCNJ10 und KCNJ16 mit Calbindin und weiteren selektiven Markern für distale Nephronabschnitte durchgeführt und dadurch die Expression von KCNJ16 in distalen Tubulussegmenten bestätigt [69]. Um die Lokalisation von KCNJ16 in der Zellmembran von distalen Tubuluszellen genauer zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere immunhistochemische Färbungen an Nieren von KCNJ16^{+/+} Mäusen durchgeführt. In Abbildung 15 ist eine Detailaufnahme einiger Nierentubuli zu sehen. Man kann erkennen, dass KCNJ16 in der basolateralen Membran lokalisiert ist, wohingegen sich AQP2 ausschließlich in den Hauptzellen der luminalen Membran befindet. Durch die tiefen Einfaltungen der basolateralen Membran erscheint es so, als wäre KCNJ16 auch im Zytosol lokalisiert.

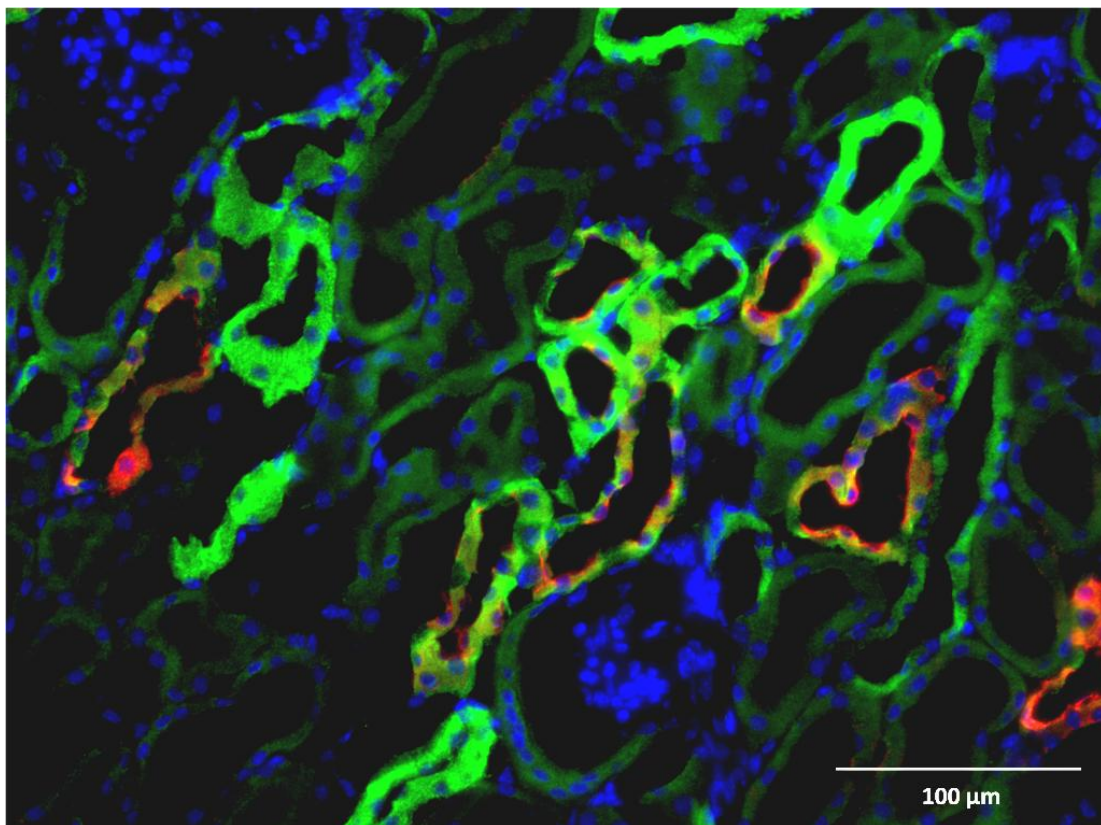


Abbildung 15: Detailaufnahmen der Nierentubuli von KCNJ16^{+/+} Mäusen

Während AQP2 (rot) erkennbar in der luminalen Membran exprimiert wird, ist KCNJ16 (grün) in der basolateralen Membran lokalisiert. Durch die tiefen Membranfalten der basolateralen Membran scheint es so, als würde sich KCNJ16 im Zytosol der Zelle befinden. Die Zellkerne (blau) wurden mit Hoechst-Farbstoff eingefärbt, um Strukturen leichter erkennbar zu machen.

4.2 In vivo Experimente

4.2.1 Wachstum und Entwicklung von KCNJ16 Mäusen

Paulais *et al.* haben bei ihrem KCNJ16 Knockout-Mausmodell ein um 15 % vermindertes Körpergewicht im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollmäusen festgestellt [93]. Daher wurden auch von den von uns verwendeten KCNJ16 Mäusen Wachstumskurven erstellt. Dazu wurden 10 KCNJ16^{+/+} und 13 KCNJ16^{-/-} Mäuse ab einem Alter von drei Tagen täglich (nach Entleeren der Blase durch leichten Druck auf den unteren Bauchraum) über einen Zeitraum von knapp fünf Wochen gewogen. Zwischen beiden Gruppen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Wachstum und der Entwicklung festgestellt werden (Abbildung 16). Beide Gruppen nahmen zunächst kontinuierlich an Gewicht zu. Zwischen Tag 15 und 24 befanden sich die Tiere in der typischen Plateauphase, die durch die Umstellung von Muttermilch auf feste Futterpellets bedingt ist. Danach nahmen beide Gruppen in gleichem Maße weiter an Gewicht zu. Die KCNJ16^{-/-} Mäuse zeigten auch sonst keine augenscheinlichen morphologischen Veränderungen oder Verhaltensauffälligkeiten. Mit bloßem Auge konnte daher nicht zwischen Wildtyp- und Knockouttieren unterscheiden werden.

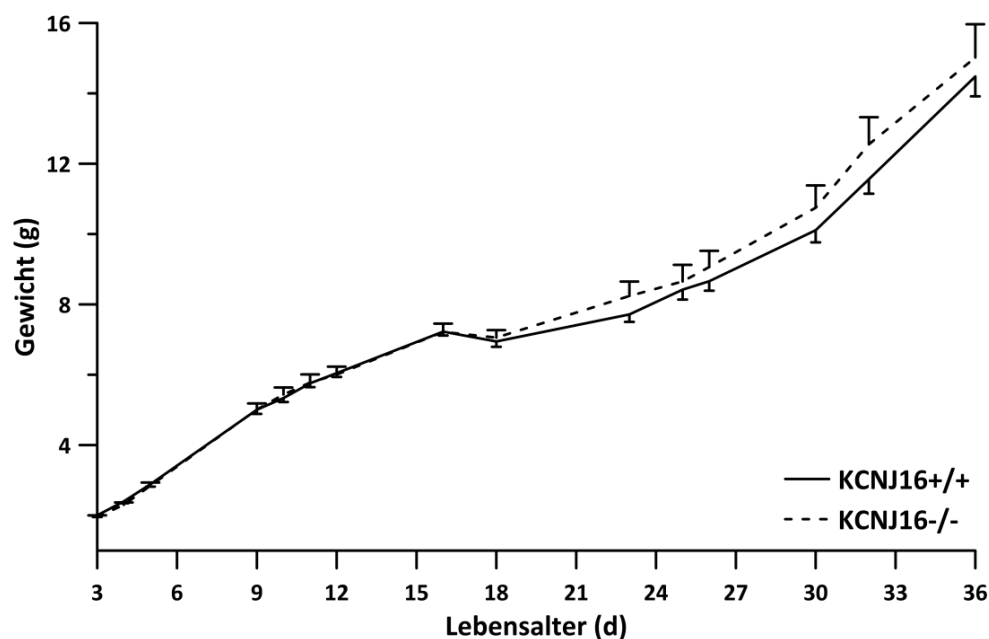


Abbildung 16: Wachstumskurven von KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen

Beide Gruppen zeigten den gleichen Wachstumsverlauf ohne signifikante Unterschiede. Zwischen Tag 15 und etwa Tag 24 nach Geburt befanden sich sowohl KCNJ16 Wildtyp als auch KCNJ16 Knockout Mäuse in der typischen Plateauphase, in der sie kaum an Gewicht zunahmen. Dieses Plateau entsteht durch die Futterumstellung von Muttermilch auf feste Nahrung.

4.2.2 Auswirkungen des KCNJ16 Knockouts auf den Elektrolythaushalt

Die KCNJ16 Untereinheit wird besonders stark in der Niere exprimiert und bildet dort sehr wahrscheinlich heteromere Kaliumkanäle zusammen mit KCNJ10. Mutationen der KCNJ10-Untereinheit führen bekanntermaßen zu erheblichen Beeinträchtigungen des Elektrolythaushaltes [24, 97] und auch bei der Patientin mit der KCNJ16-Mutation wurden Störungen der Nierenfunktion festgestellt. Daher ist anzunehmen, dass das vollständige Fehlen der KCNJ16-Untereinheit ebenfalls zu Störungen der Elektrolythomöostase führt. In der Tat konnten Paulais *et al.* bei ihren KCNJ16-Knockoutmäusen renale Salzverluste feststellen [93]. Auch bei unserem KCNJ16^{-/-} Mausmodell wurden Elektrolytmessungen in Plasma- und Urinproben durchgeführt. Da die Nieren von Mäusen nach der Geburt noch nicht vollständig ausgereift sind [98], wurden zudem Urinproben von neugeborenen Mäusen gemessen. Anhand der Elektrolytausscheidung über den Urin von Neugeborenen kann man erkennen, ob und in welchem Ausmaß bereits während der Nierenentwicklung eine Funktionsstörung vorliegt. Plasmaanalysen konnten jedoch nur bei adulten Mäusen vorgenommen werden, da die Blutmenge bei neugeborenen Mäusen nicht ausreicht, um sie für die entsprechenden Messungen einzusetzen und Verdünnungen der Plasmaproben nicht ohne eine Verfälschung der Messergebnisse möglich gewesen wären.

4.2.2.1 Elektrolytmessungen im Plasma

Die Plasmaelektrolyte wurden zunächst mit einem Ionenchromatographen (Dionex) gemessen. Später wurden die Plasma-Analysen noch durch Messungen mit einem Blutgasanalysegerät (Nova biomedical) und dem AVL Electrolyte Analyzer (Roche Diagnostics) ergänzt, da nicht alle interessanten Parameter mit dem Ionenchromatographen messbar waren. Für die ionenchromatographischen Plasmaanalysen wurden je vier adulte Wildtyp- und Knockouttiere im Alter von drei bis vier Monaten verwendet. In Abbildung 17 ist die Plasmakonzentration von Na⁺ und Cl⁻ (A) bzw. K⁺, PO₄³⁻ und SO₄²⁻ (B) in KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen dargestellt. Bei den KCNJ16^{+/+} Mäusen wurde im Plasma eine Na⁺-Konzentration von 141,50 ± 2,20 mM und eine Cl⁻-Konzentration von 115,29 ± 1,83 mM gemessen. Die KCNJ16^{-/-} Mäuse hatten eine Na⁺-Konzentration von 138,30 ± 1,86 mM und eine Cl⁻-Konzentration von 116,87 ± 2,72 mM. Weder in der Na⁺- noch in der Cl⁻-Konzentration war ein Unterschied zwischen beiden Gruppen zu erkennen. Es wurden auch die Plasmakonzentrationen von K⁺, PO₄³⁻ und SO₄²⁻

bestimmt. Hier lagen die Werte der KCNJ16^{+/+} Mäuse bei $4,91 \pm 0,26$ mM K⁺, $2,35 \pm 0,09$ mM PO₄³⁻ und $1,95 \pm 0,02$ mM SO₄²⁻ und die der KCNJ16^{-/-} Mäuse bei $4,07 \pm 0,42$ mM K⁺, $2,27 \pm 0,09$ mM PO₄³⁻ und $1,74 \pm 0,04$ mM SO₄²⁻. Zwischen den K⁺-Konzentrationen und den SO₄²⁻-Konzentrationen im Plasma bestanden signifikante Unterschiede ($p = 0,045$ bzw. $p = 0,004$).

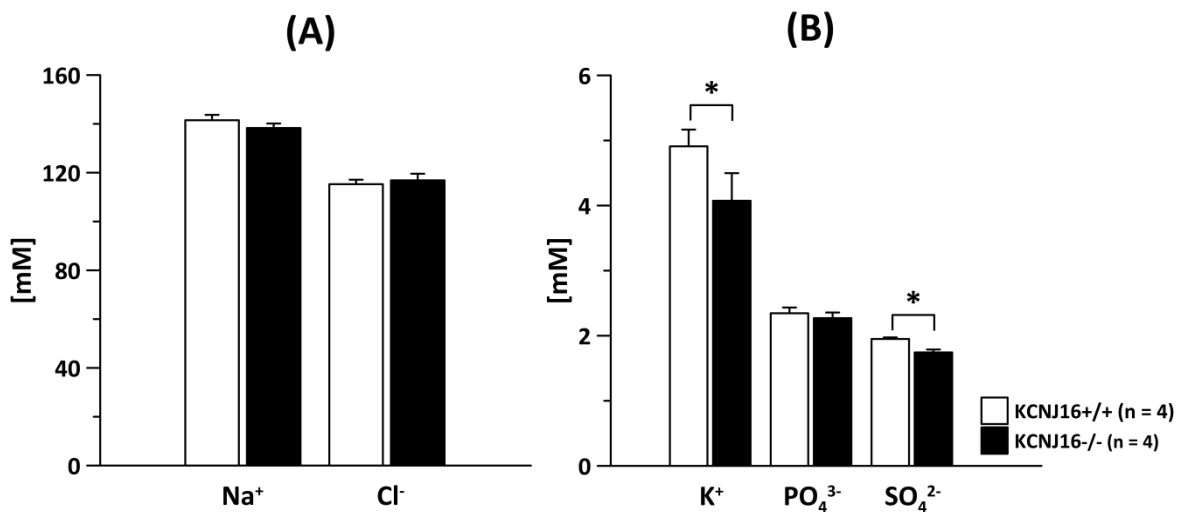


Abbildung 17: Elektrokonzentrationen im Plasma von KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen (Ionenchromatographie)

(A) Weder in der Na⁺- noch in der Cl⁻-Konzentration im Plasma bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Knockoutmäusen. **(B)** Während sich die PO₄³⁻-Konzentration von KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen nicht voneinander unterschieden, waren die K⁺- und SO₄²⁻-Konzentrationen bei den KCNJ16^{-/-} Mäusen signifikant erniedrigt.

Um die Befunde der Ionenchromatographie mit einer höheren Anzahl an Versuchstieren zu überprüfen und um weitere interessante Parameter zu messen, wurden Plasmaproben mit dem Blutgasanalysegerät und dem AVL Electrolyte Analyzer untersucht. Dazu wurden Blutproben von jeweils 14 Wildtyp- und Knockoutmäusen im Alter von drei bis vier Monaten über die *Aorta abdominalis* abgenommen und sofort am Blutgasanalysator bzw. AVL vermessen. Abbildung 18 zeigt die Elektrokonzentrationen von Na⁺ und Cl⁻ im Plasma von KCNJ16 Wildtyp- und Knockoutmäusen, gemessen mit dem AVL Electrolyte Analyzer (A), sowie von K⁺, Mg²⁺ und Ca²⁺, gemessen mit dem Blutgasanalysegerät (B). Die Na⁺-Konzentration lag bei Wildtypmäusen bei $142 \pm 0,95$ mM und bei Knockoutmäusen bei $144,07 \pm 0,85$ mM. Die Cl⁻-Konzentrationen lagen bei $112,43 \pm 0,72$ mM (KCNJ16^{+/+}) und $114,50 \pm 0,80$ mM (KCNJ16^{-/-}). Damit unterschieden sich diese Messergebnisse leicht

von den Ergebnissen der Ionenchromatographie, doch auch bei den Messungen mit dem AVL Electrolyte Analyzer bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Na^+ - und Cl^- -Konzentrationen im Plasma der Wildtyp- und Knockoutmäuse.

Bestätigt wurde zudem der Unterschied in der K^+ -Konzentration bei $\text{KCNJ16}^{+/+}$ ($4,08 \pm 0,08 \text{ mM}$) und $\text{KCNJ16}^{-/-}$ Mäusen ($3,54 \pm 0,09 \text{ mM}$; $p < 0,001$), auch wenn sich die Messergebnisse der Blutgasanalyse wiederum leicht von denen der Ionenchromatographie unterschieden. Mit dem Blutgasanalysegerät wurden zudem die Plasmakonzentrationen von Mg^{2+} und Ca^{2+} bestimmt. Während sich die Ca^{2+} -Konzentrationen mit $1,03 \pm 0,02 \text{ mM}$ ($\text{KCNJ16}^{+/+}$) und $1,08 \pm 0,02 \text{ mM}$ ($\text{KCNJ16}^{-/-}$) nicht voneinander unterschieden, zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Mg^{2+} -Konzentrationen ($\text{KCNJ16}^{+/+}$: $0,40 \pm 0,01 \text{ mM}$, $\text{KCNJ16}^{-/-}$: $0,44 \pm 0,01 \text{ mM}$; $p = 0,025$).

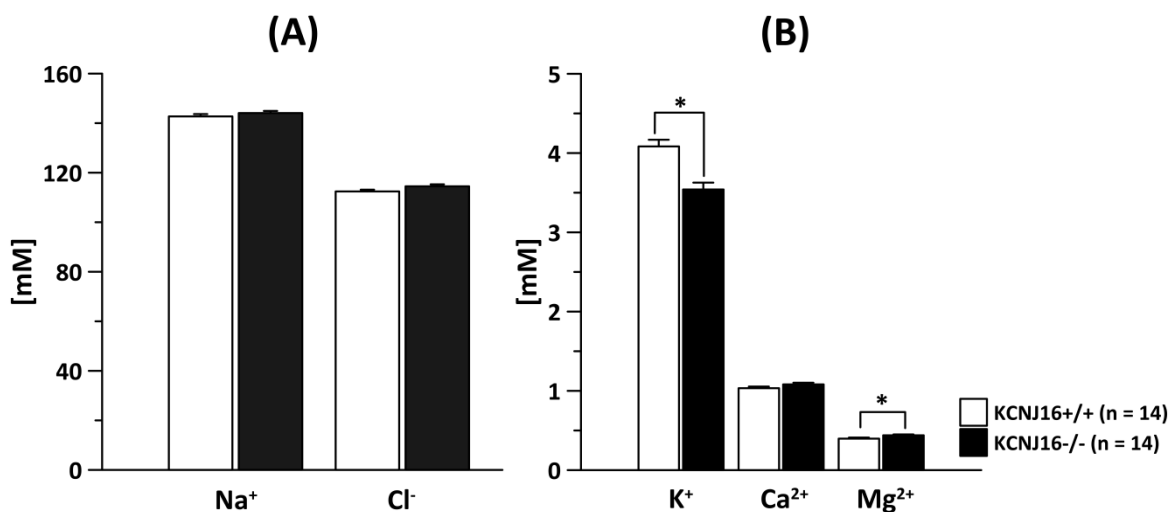


Abbildung 18: Elektrolytkonzentrationen im Plasma von $\text{KCNJ16}^{+/+}$ und $\text{KCNJ16}^{-/-}$ Mäusen (AVL-Gerät bzw. Blutgasanalysator)

(A) Wie auch bei den ionenchromatographischen Messungen bestand bei den Messungen von Na^+ und Cl^- mit dem AVL Elektrolytmessgerät kein signifikanter Unterschied zwischen den Plasmakonzentrationen von Wildtyp- und Knockoutmäusen. **(B)** Der Unterschied in den Plasma- K^+ -Konzentrationen bestätigte sich auch in den Messungen mit dem Blutgasanalysator. Zudem zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Mg^{2+} -Konzentration, wohingegen sich die Ca^{2+} -Konzentration beider Gruppen nicht voneinander unterschied.

4.2.2.2 Elektrolytmessungen im Urin vier Tage alter Mäuse

Für die Messung der Elektrolyte im Urin neugeborener Mäuse wurden Proben von je neun Wildtyp- und Knockoutmäusen im Alter von vier Tagen gesammelt und gemessen. Da die Konzentration der einzelnen Ionen im Urin wesentlich von der Harnkonzentrierung abhängt, kann anhand der absoluten Messwerte nur schwer eine Aussage getroffen werden, ob die Elektrolytausscheidung von Knockouttieren im Vergleich zu Wildtyptieren verändert ist. Da die Kreatininkonzentration im Plasma annähernd konstant ist und Kreatinin ein frei filtrierbarer Stoff ist, der weder rückresorbiert noch in nennenswerter Menge in den Urin sezerniert wird, kann die Kreatininkonzentration im Urin als Maß für die Harnkonzentrierung dienen. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ausscheidungsdaten wurden daher alle Messwerte auf Kreatinin normalisiert.

Abbildung 19 zeigt die auf Kreatinin normalisierte Elektrolytausscheidung vier Tage alter Mäuse. In der renalen Ausscheidung fast aller untersuchten Ionen zeigten beide Gruppen signifikante, zum Teil sogar höchst signifikante Unterschiede. Die einzige Ausnahme bildet die SO_4^{2-} -Ausscheidung, die bei beiden Gruppen annähernd gleich war. Die einzelnen Mittelwerte, die dem Graphen zugrunde liegen, sind mit den jeweiligen SEM und p-Werten in Tabelle 1 dargestellt.

	KCNJ16 ^{+/+}		KCNJ16 ^{-/-}		p-Wert
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
Na⁺	3,96	1,06	15,76	1,62	< 0,001
K⁺	128,28	3,95	69,83	4,20	< 0,001
Mg²⁺	10,39	0,65	15,66	0,60	< 0,001
Ca²⁺	2,13	0,41	4,18	0,55	0,01
Cl⁻	100,49	5,31	66,05	6,41	< 0,001
PO₄³⁻	15,84	2,92	7,08	2,06	0,03
SO₄²⁻	23,34	7,06	20,28	1,10	0,68

Tabelle 1: Elektrolytausscheidung vier Tage alter KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäuse

Alle Werte sind auf die renale Kreatininausscheidung normalisiert und in [mM/mM Kreatinin] angegeben.

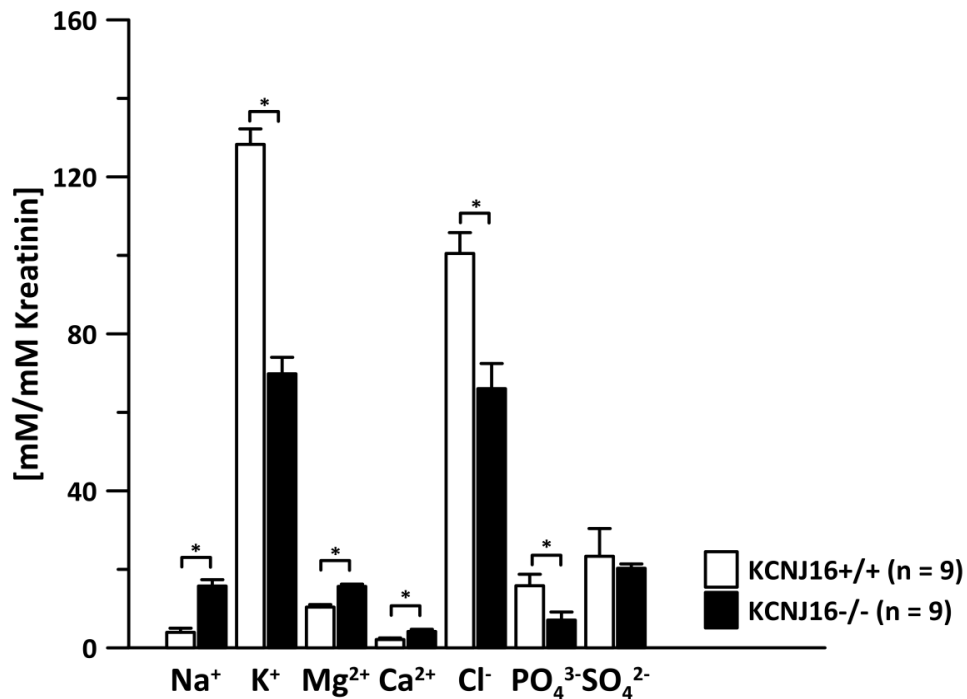
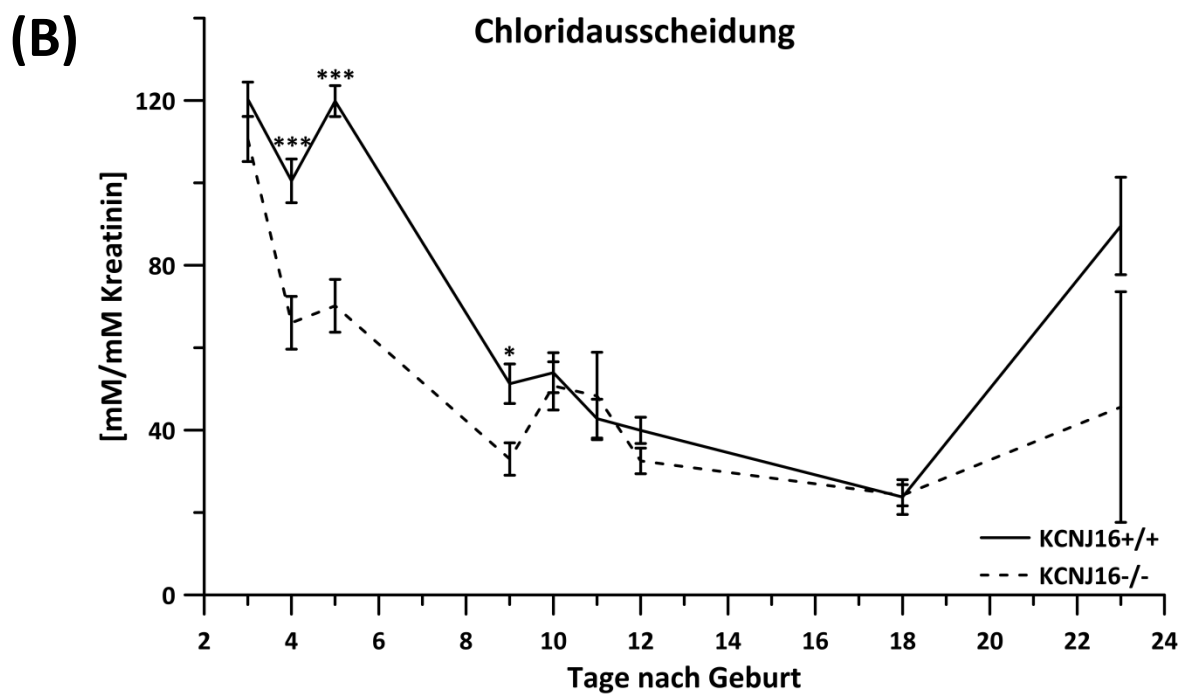
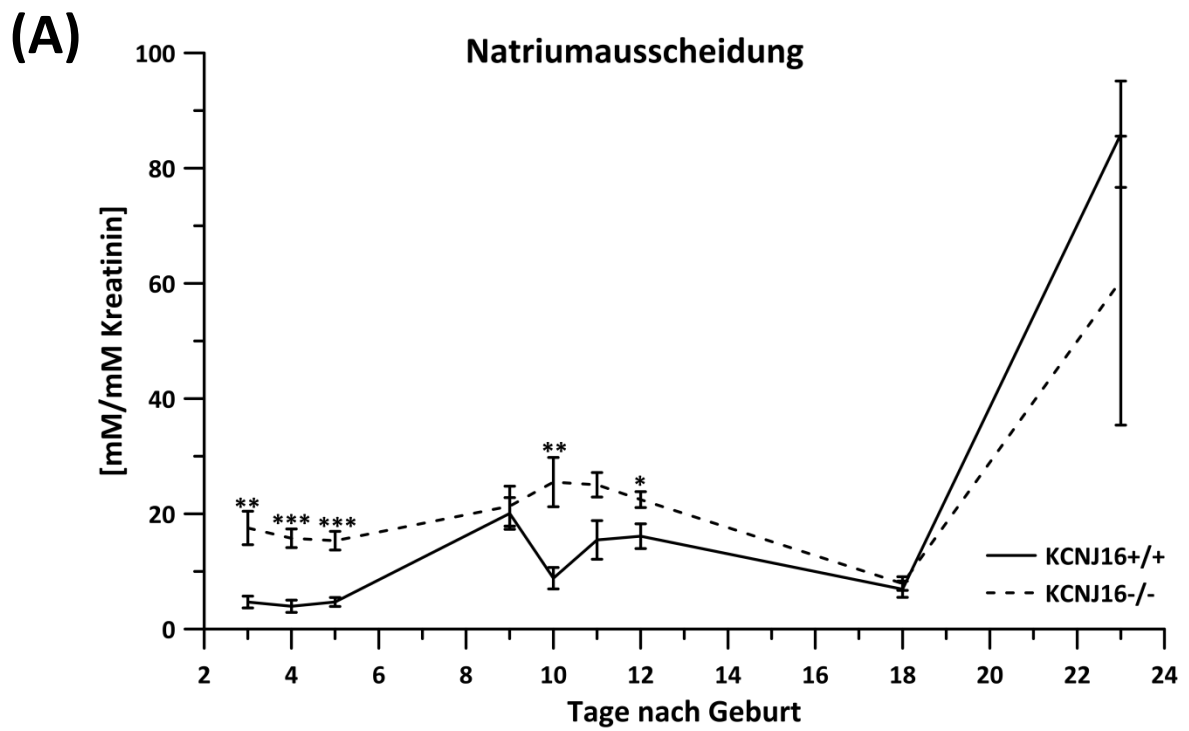


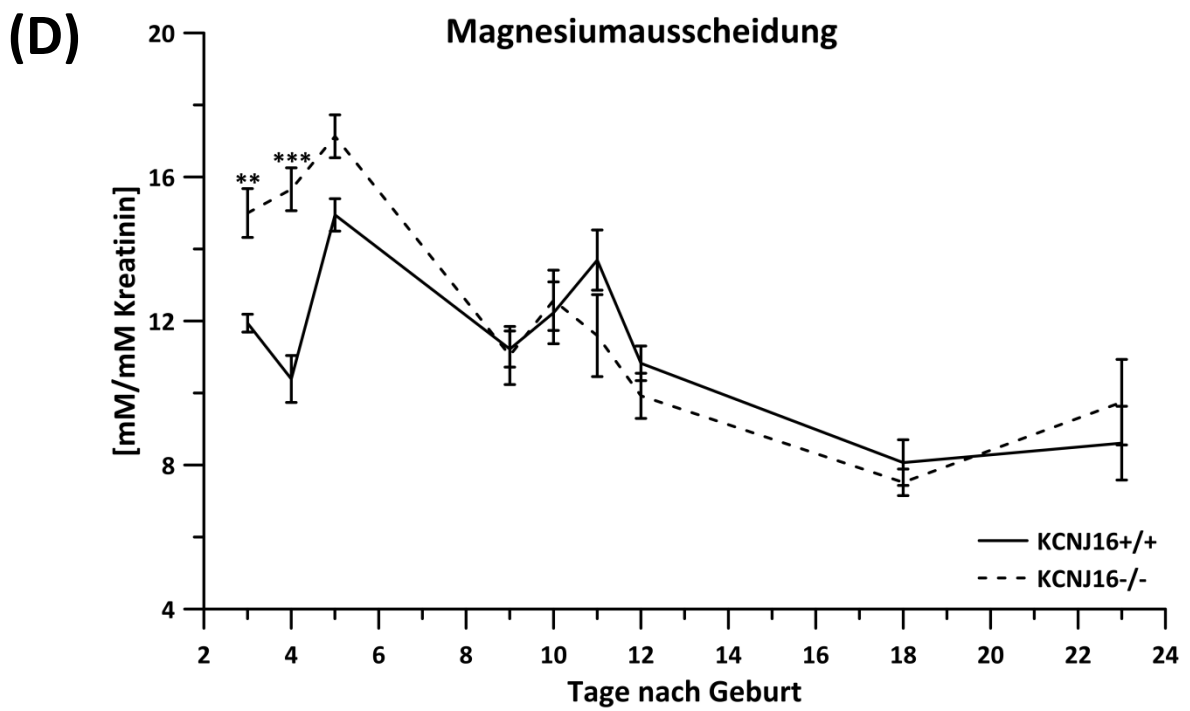
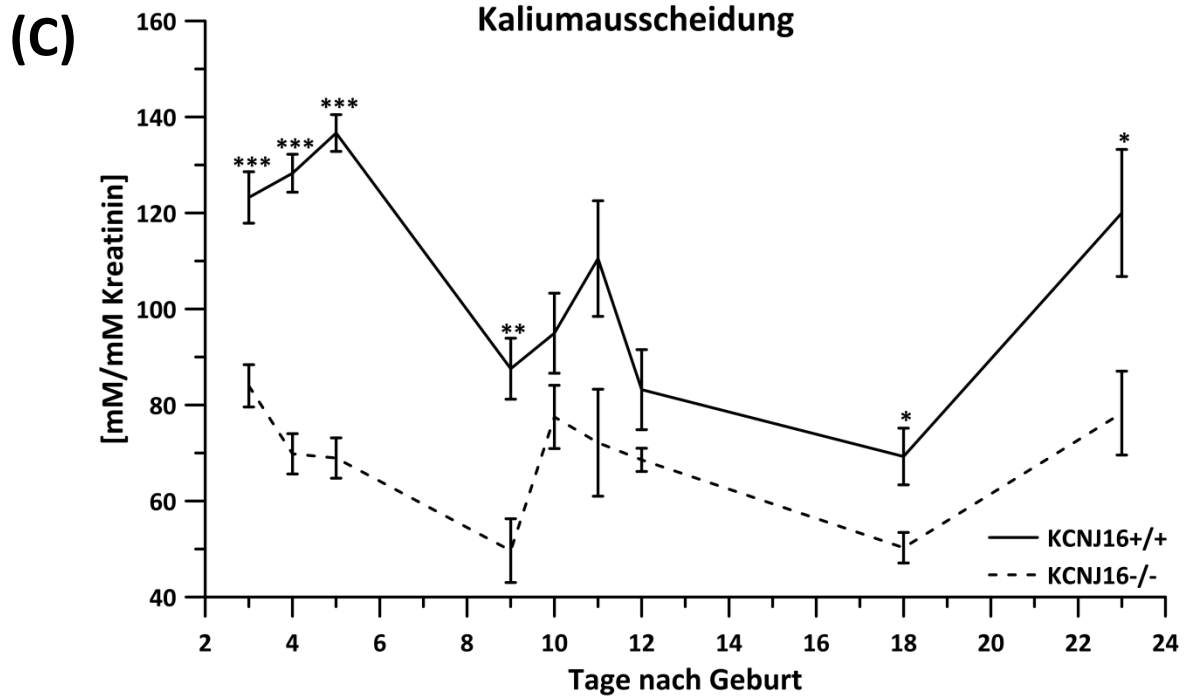
Abbildung 19: Renale Elektrolytausscheidung vier Tage alter KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäuse

Die Daten wurden auf die Kreatininkonzentration im Urin normalisiert. Mit Ausnahme der SO₄²⁻-Ausscheidung war die renale Ausscheidung aller untersuchten Ionen bei den KCNJ16^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den KCNJ16^{+/+} Mäusen verändert.

4.2.2.3 Altersabhängige Elektrolytausscheidung

Um zu überprüfen, ob und in welchem Umfang sich die Elektrolytausscheidung bei KCNJ16^{-/-} Mäusen während der Nierenreifung verändert, wurde die renale Ausscheidung der wichtigsten Ionen über einen längeren Zeitraum hinweg beobachtet. Dazu wurde Spontanurin von jeweils neun KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen über einen Zeitraum von etwa drei Wochen teils täglich und teils in etwas größeren Abständen gesammelt. Der Verlauf der renalen Ausscheidung von Na⁺, Cl⁻, K⁺, Mg²⁺ und Ca²⁺ ist in Abbildung 20 dargestellt. Dabei fällt auf, dass sich die renale Exkretion praktisch aller Elektrolyte in den ersten Lebenstagen (bis Tag 5 p.p.) der KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäuse deutlich voneinander unterschied. So verloren KCNJ16^{-/-} Mäuse in den ersten Lebenstagen mehr Na⁺, Mg²⁺ und Ca²⁺ über den Urin als KCNJ16^{+/+} Mäuse, wohingegen die renale Ausscheidung von Cl⁻ und K⁺ von KCNJ16^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen erniedrigt war. Im Laufe der Nierenreifung glich sich die Elektrolytausscheidungen fast aller Ionen bei Wildtyp- und Knockoutmäusen aneinander an. Die im Vergleich zu den Wildtypmäusen signifikant erniedrigte K⁺-Ausscheidung der KCNJ16^{-/-} Mäuse blieb jedoch bis Tag 23 p.p. bestehen.





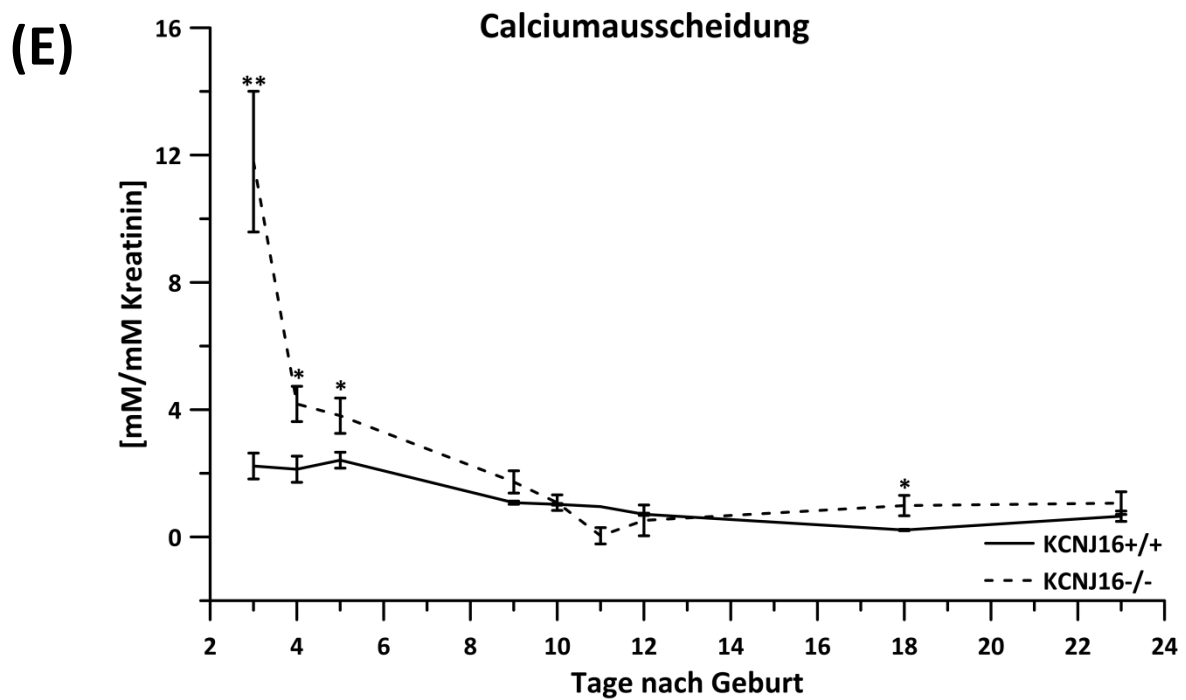


Abbildung 20: Altersabhängige Ausscheidung verschiedener Elektrolyte von KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen über den Urin

Die Ausscheidung von Natrium (A), Chlorid (B), Kalium (C), Magnesium (D) und Calcium (E) über den Urin wurde bei KCNJ16 Wildtyp- und Knockoutmäusen in den ersten Lebenswochen untersucht. Bei allen Elektrolyten bestanden signifikante Unterschiede in der renalen Ausscheidung in den ersten Tagen nach der Geburt (Tage 3 bis 5 p.p.). Im Laufe der Entwicklung der Mäuse verschwanden diese Unterschiede bei praktisch allen Elektrolyten, mit Ausnahme von Kalium.

4.2.2.4 Elektrolytmessungen im Urin adulter Mäuse

Neben der Analyse der renalen Exkretion junger Mäuse wurden auch Analysen der Elektrolytausscheidung adulter Mäuse durchgeführt. Dazu wurde der Urin von je sechs KCNJ16 Wildtyp- und Knockoutmäusen im Alter von zwei bis vier Monaten untersucht. Die Analysen wurden mit dem Ionenchromatographen durchgeführt. In Abbildung 21 ist die auf Kreatinin normalisierte Elektrolytausscheidung von Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} und SO_4^{2-} von KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen dargestellt. Die Messwerte, die Abbildung 21 zugrunde liegen, sind in Tabelle 2 mit ihren jeweiligen SEM und p-Werten dargestellt. Bei den adulten Tieren war nur noch bei der PO_4^{3-} -Ausscheidung ein signifikanter Unterschied feststellbar. Bemerkenswert ist, dass auch der während der Entwicklung lange bestehende Unterschied in der K^+ -Ausscheidung bei den erwachsenen Tieren

verschwunden ist. Im Gegensatz zur Ausscheidung bei jungen Mäusen ist die Kaliumausscheidung der adulten Knockoutmäuse tendenziell noch leicht erhöht.

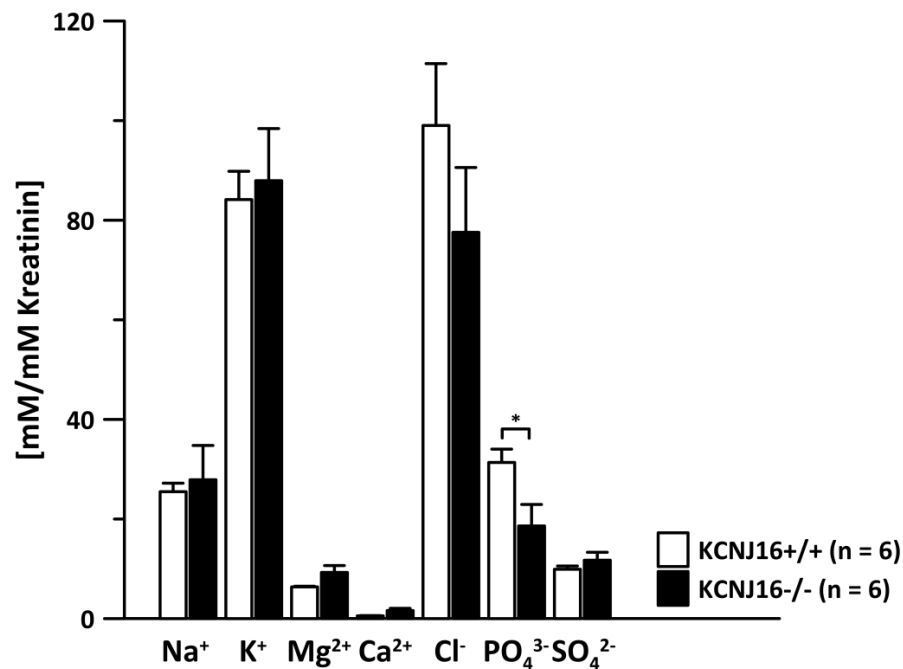


Abbildung 21: Renale Elektrolytausscheidung adulter KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäuse (Ionenchromatograph)

Die Ausscheidungsdaten wurden auf die Kreatinin-Konzentration im Urin normalisiert. Außer bei der PO₄³⁻-Ausscheidung bestand kein signifikanter Unterschied in der renalen Ausscheidung der untersuchten Elektrolyte bei adulten Wildtyp- und Knockoutmäusen. Bei den voll ausgereiften Tieren ist auch der lange bestehende signifikante Unterschied in der K⁺-Ausscheidung verschwunden.

	KCNJ16 ^{+/+}		KCNJ16 ^{-/-}		p-Wert
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
Na ⁺	25,49	1,71	27,89	6,89	0,748
K ⁺	84,15	5,67	87,95	10,46	0,758
Mg ²⁺	6,38	0,13	9,28	1,38	0,089
Ca ²⁺	0,57	0,04	1,63	0,44	0,061
Cl ⁻	99,03	12,42	77,57	13,02	0,261
PO ₄ ³⁻	31,36	2,67	18,61	4,31	0,035
SO ₄ ²⁻	9,92	0,65	11,74	1,59	0,326

Tabelle 2: Elektrolytausscheidung adulter KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäuse

Alle Werte sind auf die renale Kreatininausscheidung normalisiert und in [mM/mM Kreatinin] angegeben.

4.2.2.5 Elektrolyt- und Wasserausscheidung unter Einfluss von Amilorid und HCT

Während der Experimente zur Ermittlung der GFR von KCNJ16 Wildtyp- und Knockoutmäusen wurden in der letzten Phase der Experimente die beiden Diuretika Amilorid und Hydrochlorothiazid (HCT) in den Bauchraum der Mäuse appliziert (5 µg/g KG Amilorid und 20 µg/g KG HCT). HCT hemmt den NCC-Transporter im distalen Tubulus und kann somit Aufschluss über eventuell vorhandene Transportdefekte im DCT geben. Amilorid hingegen hemmt den ENaC im Sammelrohr und verhindert eine Kompensation des NaCl-Verlustes, der durch die Applikation von HCT verursacht wird, in distalen Nephronabschnitten. Da vor und nach der Diuretikaapplikation Urinproben mittels Blasenpunktion gewonnen wurden, konnte der Einfluss der beiden Diuretika auf die renale Elektrolytausscheidung mit Hilfe von ionenchromatographischen Messungen untersucht werden.

Abbildung 22 A bis E zeigt die Ausscheidung von Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} bei KCNJ16 Wildtyp- und Knockoutmäusen (jeweils $n = 9$) jeweils unter Kontrollbedingungen und unter dem Einfluss von Amilorid und HCT. Während am wachen Tier keine signifikanten Unterschiede in der Ausscheidung von Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} und Ca^{2+} von Wildtyp- und Knockoutmäusen bestanden (vgl. 4.2.2.4), konnten bei den narkotisierten Tieren hingegen Unterschiede in der renalen Exkretion der genannten Elektrolyte festgestellt werden. Fast alle Unterschiede zwischen beiden Gruppen verschwanden jedoch nach der Applikation der Diuretika. Lediglich der Unterschied in der Ca^{2+} -Exkretion blieb auch unter Diuretikaeinfluss bestehen. Sowohl KCNJ16^{+/+} als auch KCNJ16^{-/-} Mäuse reagierten auf die Applikation der Diuretika mit einem deutlichen Anstieg der renalen Na^+ - und Cl^- -Exkretion, wohingegen die K^+ -Ausscheidung drastisch abnahm. Die Ausscheidung von Mg^{2+} und Ca^{2+} über den Urin wurde von der Diuretikaapplikation nicht beeinflusst.

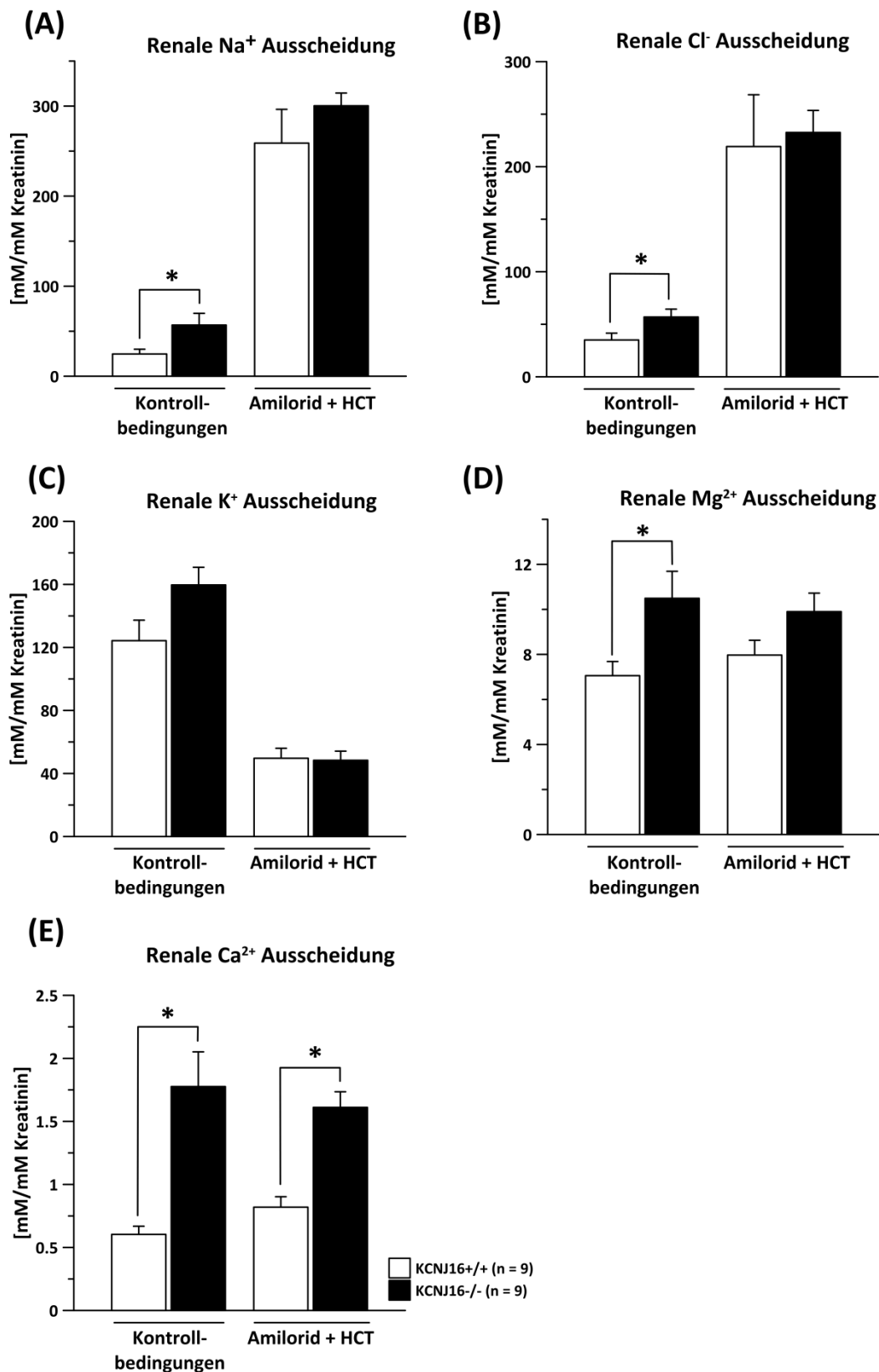


Abbildung 22: Renale Elektrolytausscheidung vor und nach der Applikation von Diuretika

Unter Kontrollbedingungen war die renale Ausscheidung aller Elektrolyte (bis auf K⁺) bei KCNJ16^{-/-} Mäusen signifikant erhöht. Nach der Applikation der Diuretika verschwanden fast alle Unterschiede, nur der Unterschied in der Ca²⁺-Ausscheidung blieb bestehen. Beide Gruppen reagierten auf die Diuretika mit einem Anstieg der Na⁺ und Cl⁻-Exkretion und einem Abfall der K⁺-Exkretion. Die Mg²⁺- und Ca²⁺-Ausscheidung blieb bei beiden Gruppen vom Einfluss der Diuretika unberührt.

Während der Inulin-Clearance Messungen wurden alle 30 min Urinproben über Punktion der Blase genommen, wobei die Blase vollständig entleert wurde. Da der entnommene Urin über einen bekannten Zeitraum produziert wurde, eignen sich diese Proben sehr gut dazu, die Harnkonzentrierung der KCNJ16 Wildtyp- und Knockoutmäuse zu untersuchen. Oft gehen renale Tubulopathien mit einer Polyurie einher, da die erhöhte Salzmenge im Urin osmotisch Wasser nach sich zieht. Um zu untersuchen, ob KCNJ16^{-/-} Mäuse Probleme mit der Harnkonzentrierung haben, wurde daher ihr Urinfluss mit dem von KCNJ16^{+/+} Mäusen unter Kontrollbedingungen und unter Diuretikaefluss miteinander verglichen (Abbildung 23 A). Zudem kann die Kreatininmenge im Urin wie erwähnt als Maß für die Harnkonzentrierung dienen. Daher wurden auch die Kreatininkonzentrationen im Urin miteinander verglichen (Abbildung 23 B). Weder unter Kontrollbedingungen noch unter dem Einfluss von Diuretika unterschieden sich Urinfluss und renale Kreatininkonzentration von KCNJ16 Wildtyp- und Knockoutmäusen. Unter Kontrollbedingungen produzierten die KCNJ16^{+/+} Mäuse $1,28 \pm 0,19 \mu\text{l}$ und die KCNJ16^{-/-} Mäuse $1,43 \pm 0,19 \mu\text{l}$ Urin pro Minute. Nach Applikation der Diuretika stieg die Urinausscheidung von KCNJ16^{+/+} Mäusen auf $3,77 \pm 0,83 \mu\text{l}/\text{min}$ und die von KCNJ16^{-/-} Mäusen auf $3,23 \pm 0,45 \mu\text{l}/\text{min}$. Die Kreatininkonzentration lag bei den KCNJ16^{+/+} Mäusen unter Kontrollbedingungen bei $2,76 \pm 0,19 \text{ mM}$ und unter Diuretikaefluss bei $0,85 \pm 0,19 \text{ mM}$. Bei den KCNJ16^{-/-} Mäusen betrug die Konzentration von Kreatinin im Urin $2,14 \pm 0,27 \text{ mM}$ (Kontrollbedingungen) bzw. $0,72 \pm 0,14 \text{ mM}$ (Diuretika). Die Fähigkeit zur Harnkonzentrierung scheint bei den KCNJ16^{-/-} Mäusen also nicht beeinträchtigt zu sein.

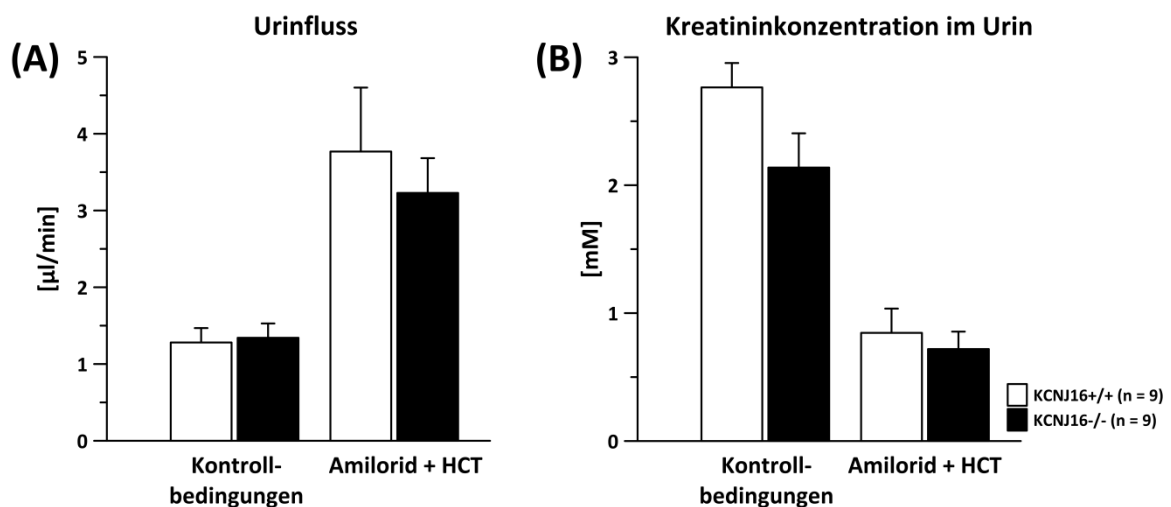


Abbildung 23: Urinfluss und renale Kreatininkonzentration von KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen
Zwischen beiden Gruppen waren keine Unterschiede im Urinfluss und der Konzentration von Kreatinin im Urin feststellbar.

4.2.2.6 Blutgase und Säure-Basen-Haushalt

KCNJ16 ist an der chemosensorischen Atemkontrolle beteiligt, daher kann ein Knockout von KCNJ16 zu veränderten Blutgaswerten führen [94]. KCNJ16 ist außerdem sehr stark in der Niere exprimiert, die ebenfalls an der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes im Körper beteiligt ist. Somit kann ein Fehlen der KCNJ16 Untereinheit zu Störungen im Säure-Basen-Gleichgewicht führen. Um dies zu untersuchen, wurden in den Blutproben adulter KCNJ16 Wildtyp- und Knockoutmäuse auch die Parameter pO_2 , pCO_2 , pH und HCO_3^- mit Hilfe des Blutgasanalysators gemessen (Abbildung 24). Es wurden je 14 Wildtyp- und Knockoutmäuse im Alter von drei bis vier Monaten verwendet (vgl. Abschnitt 4.2.2.1).

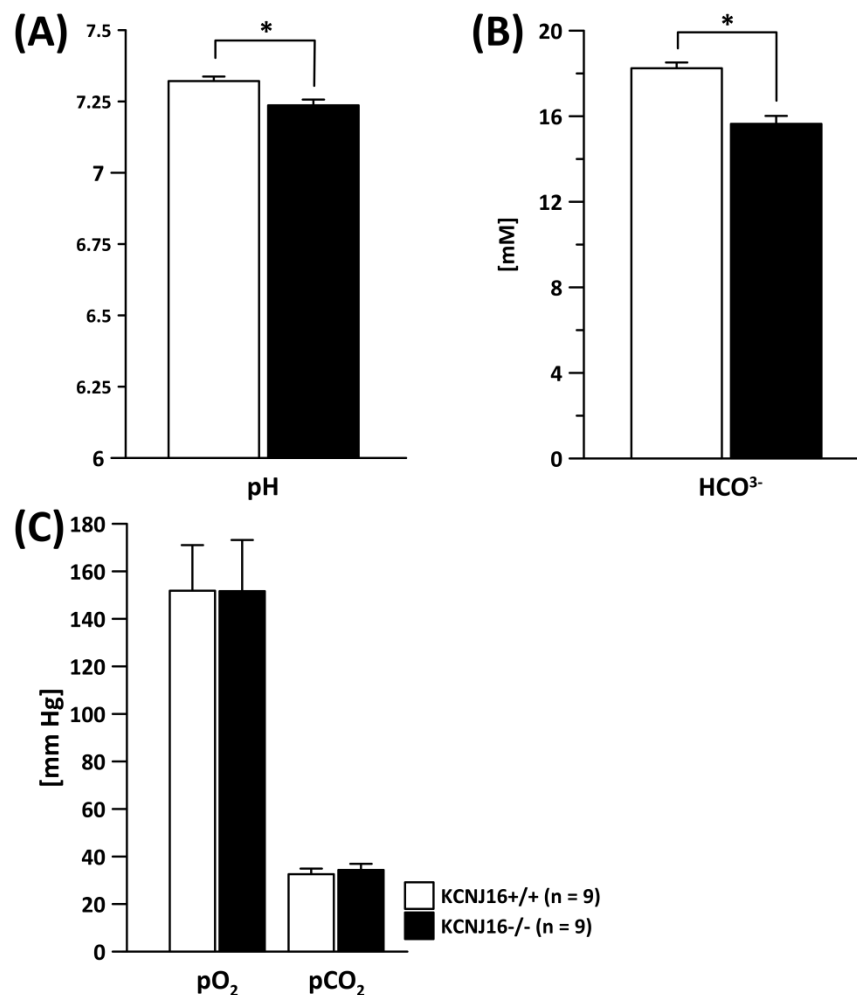


Abbildung 24: pH-, HCO_3^- - und Blutgaswerte adulter KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäuse

Der pH-Wert der KCNJ16^{-/-} Mäuse zeigte einen signifikanten Unterschied zum pH-Wert der KCNJ16^{+/+} Mäuse. Auch der HCO_3^- -Wert war bei den KCNJ16^{-/-} Mäusen deutlich erniedrigt, während pO_2 und pCO_2 normale Werte aufwiesen.

Der pH-Wert im Blut von KCNJ16^{-/-} Mäusen war gegenüber dem von Wildtypmäusen signifikant erniedrigt (KCNJ16^{+/+}: pH 7,32 ± 0,02, KCNJ16^{-/-}: pH 7,24 ± 0,02; p = 0,003). Auch die HCO₃⁻-Konzentration im Plasma der Knockouttiere lag deutlich niedriger als die der Wildtyptiere (KCNJ16^{+/+}: 18,24 ± 0,27 mM, KCNJ16^{-/-}: 15,67 ± 0,37 mM; p < 0,001). Die pO₂ und pCO₂ Werte beider Gruppen unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander (pO₂ KCNJ16^{+/+}: 151,84 ± 19,19 mm Hg, KCNJ16^{-/-}: 151,66 ± 21,52 mm Hg; pCO₂ KCNJ16^{+/+}: 32,57 ± 2,36 mm Hg, KCNJ16^{-/-}: 34,36 ± 2,58 mm Hg). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die KCNJ16^{-/-} Mäuse unter einer metabolischen Azidose leiden.

4.2.2.7 Aldosteronmessungen

Wie eingangs erwähnt, sind viele Hormone an der Regulation der Rückresorptionsvorgänge in der Niere beteiligt. Eines dieser Hormone ist Aldosteron, das über das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) u. a. bei zu niedriger NaCl-Konzentration im Primärharn ausgeschüttet wird. Aldosteron senkt die GFR durch Kontraktion des *Vas afferens* und stimuliert außerdem die Transkription von ENaC, ROMK und der Na⁺-K⁺-ATPase im Sammelrohr. Dadurch soll die niedrige Salzkonzentration im Körper korrigiert und der systemische Blutdruck stabilisiert werden. Da das Fehlen der KCNJ16 Unter-einheit zu Störungen im Elektrolythaushalt führt, wurde daher überprüft, ob sich der Aldosteronspiegel im Plasma von KCNJ16^{-/-} Mäusen durch diese Elektrolytstörungen ändert. Dazu wurde das Plasma von je 14 Wildtyp- und Knockoutmäusen mit Hilfe eines Aldosteron-ELISAs (IBL) untersucht. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, unterschieden sich die Aldosteronwerte von KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen jedoch nicht voneinander (KCNJ16^{+/+}: 689,07 ± 53,42 pg/ml, KCNJ16^{-/-}: 676,64 ± 76,64 pg/ml; p = 0,895).

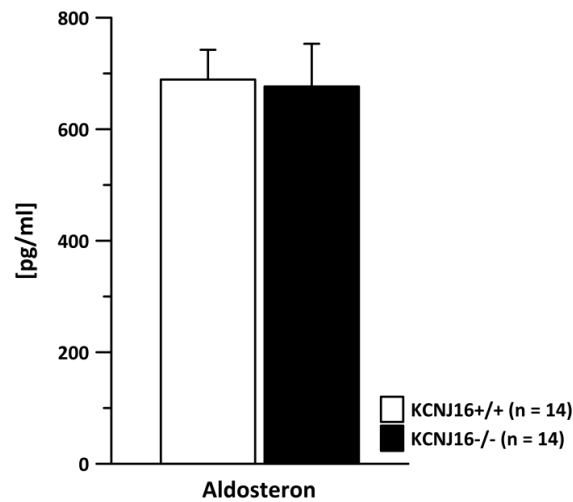


Abbildung 25: Aldosteronwerte im Plasma von KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen

KCNJ16 Wildtyp- und Knockoutmäuse wiesen keinen signifikanten Unterschied in ihrem Plasma-Aldosteronspiegel auf.

4.2.3 Blutdruckmessungen

Die Nieren sind über die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes wesentlich an der Blutdruckregulation beteiligt. Störungen in der Wasser- und Elektrolythomöostase führen daher oft zu einem veränderten Blutdruck. Um zu untersuchen, ob der Knockout der KCNJ16 Untereinheit eine Auswirkung auf den Blutdruck hat, wurde der systolische Blutdruck von KCNJ16^{-/-} Mäusen (n = 5) am wachen Tier über die Tail-Cuff Methode gemessen und mit den Werten von KCNJ16^{+/+} Mäusen (n = 6) verglichen. Die Messungen erfolgten an 14 Messtagen über einen Zeitraum von drei Wochen. Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, erreichten die Messwerte erst ab dem 9. Messtag ein stabiles Niveau, weshalb nur die Werte ab diesem Tag für die abschließende Auswertung verwendet wurden.

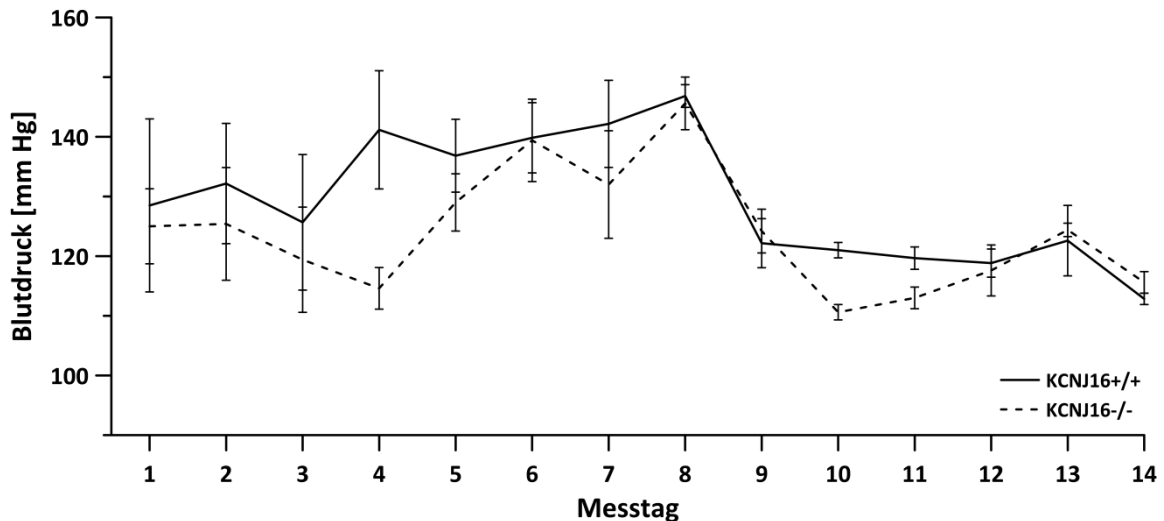


Abbildung 26: Verlauf der Blutdruckmessungen

In den ersten Tagen der Blutdruckmessungen waren die Messwerte durch die Aufregung der Tiere zum Teil noch sehr hoch und zeigten große Schwankungen und Streuungen. Erst ab dem 9. Tag hatten sich die Mäuse ausreichend gut an die Messprozedur gewöhnt, so dass die Messwerte niedriger, stabiler und reproduzierbarer waren.

Die Mittelwerte aus den Messungen der Tage 9 bis 14 sind in Abbildung 27 dargestellt. Der systolische Blutdruck von KCNJ16 Wildtypmäusen lag bei $119,5 \pm 1,9$ mm Hg und der von Knockoutmäusen bei $117,6 \pm 1,0$ mm Hg. Zwischen beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

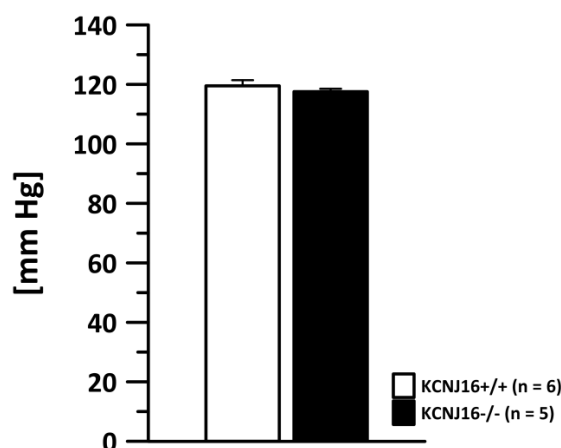


Abbildung 27: Systolischer Blutdruck von KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen

Der systolische Blutdruck von KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen wies keinen signifikanten Unterschied auf (Auswertung der dritten Messwoche).

4.2.4 Messung der glomerulären Filtrationsrate

Die Nieren filtrieren bei einem jungen gesunden Menschen etwa 120 ml Plasma pro Minute. Bei Mäusen liegt die filtrierte Plasmamenge (abhängig vom Mausstamm) bei wachen Mäusen bei etwa 12 - 15 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ KG und bei anästhesierten Tieren bei etwa 8 - 15 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ KG [99]. Die filtrierte Plasmamenge pro Zeit nennt man glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und kann über die Kreatinin- oder die Inulin-Clearance bestimmt werden. Bei chronischen Nierenerkrankungen ist die GFR oft pathologisch erniedrigt, daher ist die GFR ein wichtiger Indikator der Nierenfunktion. Um herauszufinden, ob der KCNJ16 Knockout mit einer veränderten GFR einhergeht, wurde die GFR von jeweils neun Wildtyp- bzw. Knockoutmäusen im Alter von zwei bis vier Monaten über die Messung der Inulin-Clearance bestimmt. Der genaue Ablauf der Messungen ist unter 3.2.7 beschrieben. Die GFR wurde in der Kontrollphase des Experiments bestimmt (vgl. Schema in Abbildung 9). Bei den KCNJ16^{+/+} Mäusen lag die GFR bei $9,6 \pm 0,93$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ KG, bei den KCNJ16^{-/-} Mäusen betrug die GFR $8,6 \pm 0,79$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ KG (Abbildung 28). Zwischen den Ergebnissen beider Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

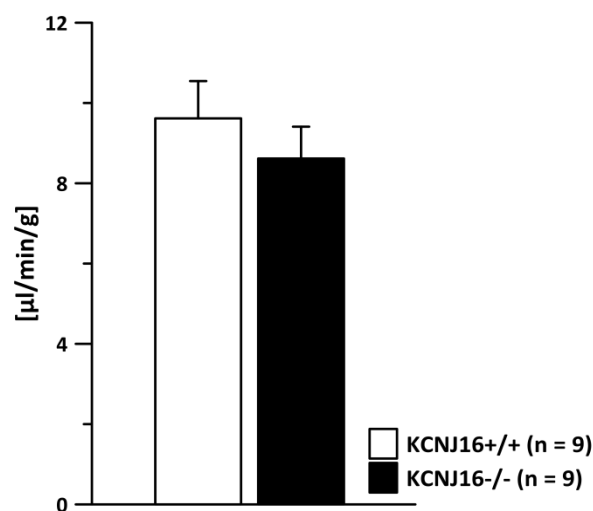


Abbildung 28: Glomeruläre Filtrationsrate von KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen

Sowohl die KCNJ16 Wildtyp- als auch die Knockoutmäuse lagen mit ihren GFR-Werten in den Bereichen der bereits publizierten Werte von anästhesierten Mäusen. Zwischen den beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied in der GFR festgestellt werden.

4.2.5 Elektrophysiologische Experimente

4.2.5.1 Whole cell Messungen

Alle bisher bekannten KCNJ10-Mutationen führen zu einer Funktionsbeeinträchtigung oder einem vollständigen Funktionsverlust des heteromeren Kanalproteins. Bei der bisher einzigen bekannten Patientin mit einer Mutation im KCNJ16-Gen wurde die Missense-Mutation R137C identifiziert. Um die Auswirkung dieser Mutation auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des KCNJ10/KCNJ16-Kanalheteromers zu untersuchen, wurden CHO-Zellen mit KCNJ10 WT und KCNJ16 WT (= KCNJ10/KCNJ16) bzw. KCNJ10 WT/ KCNJ16 R137C (= KCNJ10/R137C) jeweils im Verhältnis 1:10 transfiziert und im Whole cell Modus gemessen. Zunächst wurden das Membranpotential und der Stromfluss unter Kontrollbedingungen, d. h. unter Zulauf von Ringerlösung gemessen. Anschließend wurde 5 mM Ba^{2+} zugegeben, um die Anwesenheit von Ba^{2+} -hemmbaren Kaliumkanälen in der Zelle nachzuweisen und den Ba^{2+} -sensitiven Strom zu messen. Der Ba^{2+} -sensitive Strom ist im Wesentlichen derjenige Strom, der auf die exprimierten Kaliumkanäle zurückzuführen ist.

Abbildung 29 zeigt das Membranpotential von (schein)transfizierten CHO-Zellen unter Ringerlösung (Kontrolle) und unter Ba^{2+} (5mM). Alle (schein)transfizierten Zellen zeigten unter dem Einfluss von Ba^{2+} das gleiche Restpotential von ca. -21 mV. Das Potential von scheintransfizierten Zellen unterschied sich auch unter Kontrollbedingungen nicht von dem Potential unter Ba^{2+} -Einfluss. Unter Ringerlösung bestand ein signifikanter Unterschied im Membranpotential von Zellen, die mit KCNJ10/KCNJ16 transfiziert waren ($-77,5 \pm 2,1$ mV) und dem Membranpotential von Zellen, die mit KCNJ10/R137C transfiziert waren ($-60,6 \pm 7,0$ mV). Zudem unterschieden sich diese beiden Zellgruppen in ihrem Membranpotential signifikant von dem Membranpotential scheintransfizierter Zellen, das bei $-29 \pm 5,3$ mV lag.

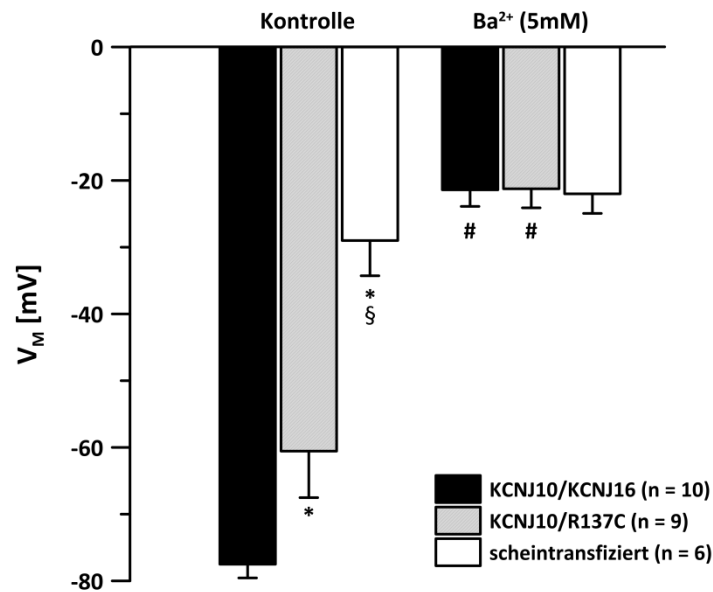


Abbildung 29: Membranpotential (schein)transfizierter CHO-Zellen unter Ringer und Ba²⁺

*: Signifikanter Unterschied zwischen dem Membranpotential von Zellen, die mit KCNJ10/KCNJ16 transfiziert wurden und von Zellen, die mit KCNJ10/R137C transfiziert bzw. scheintransfiziert wurden unter Kontrollbedingungen. §: Signifikanter Unterschied zwischen scheintransfizierten Zellen und Zellen, die mit KCNJ10/R137C transfiziert wurden. #: Signifikanter Unterschied im Membranpotential unter Kontrollbedingungen und unter Ba²⁺ (5mM).

Abbildung 30 zeigt den Ba²⁺-sensitiven Strom von (schein)transfizierten CHO-Zellen. Den Ba²⁺-sensitiven Strom ermittelt man, in dem man den Strom unter Einfluss von Ba²⁺ vom Stromfluss unter Ringerlösung bei der jeweiligen Klemmspannung subtrahiert. Der Ba²⁺-sensitive Strom ist somit derjenige Anteil am Gesamtstrom über die Zellmembran, der von Ba²⁺-hemmbaren Kaliumkanälen erzeugt wird. Die Expression von KCNJ10/KCNJ16-Heteromeren führte im U/I-Diagramm zu dem typischen Bild eines Einwärtsgleichrichters: Der Einwärtsstrom war deutlich größer als der Auswärtsstrom von Kaliumionen, wodurch die Stromkurve im Diagramm „abknickt“. Zellen, die mit KCNJ10/R137C transfiziert wurden, zeigten zwar einen Ba²⁺-sensitiven Strom, der größer als der von scheintransfizierten Zellen war. Bei den KCNJ10/R137C-Heteromeren war die Einwärtsgleichrichtung jedoch nicht mehr zu sehen. Scheintransfizierte Zellen zeigten nur einen sehr kleinen Ba²⁺-sensitiven Strom, der auf endogene Ba²⁺-hemmbare Kaliumkanäle der CHO-Zellen zurückzuführen ist. Außerdem sieht man, dass gerade bei hyperpolarisierten (physiologischen) Potentialwerten die Kaliumleitfähigkeit der Zellmembran deutlich reduziert ist (erkennbar an der geringeren Steigung des U/I-Diagramms), was für eine Beeinträchtigung der Kanalfunktion durch die Mutation spricht.

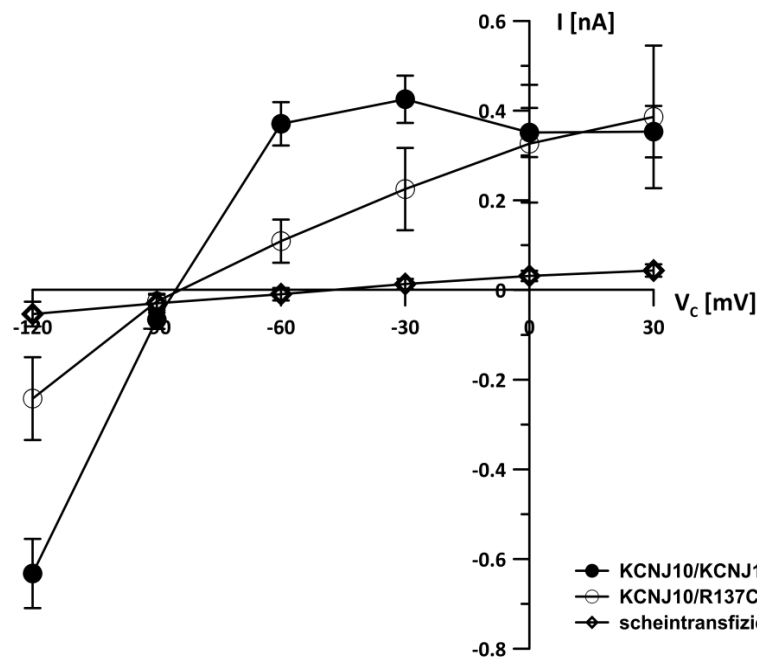


Abbildung 30: Ba²⁺-sensitiver Strom von (schein)transfizierten CHO-Zellen

KCNJ10/KCNJ16 Heteromere zeigten eine ausgeprägte Einwärtsgleichrichtung. Der Ba²⁺-sensitive Strom von KCNJ10/R137C Heteromeren war bei negativen Potentialwerten deutlich geringer und zeigte praktisch keine Einwärtsgleichrichtung mehr. Bei scheintransfizierten Zellen war nur ein äußerst geringer Ba²⁺-sensitiver Strom messbar.

4.2.5.2 Single channel Messungen

Durch Whole cell Messungen lässt sich nur herausfinden, ob die Mutation eines Kanals das Membranpotential und das makroskopische Strommuster der Zelle beeinträchtigt. Anhand von Single channel Messungen können noch weitere Parameter wie z. B. die Leitfähigkeit, die Offenwahrscheinlichkeit und die pH-Abhängigkeit des Kanals gemessen werden. Dadurch kann eine genauere Aussage darüber getroffen werden, welche Eigenschaft(en) des Kanals durch die Mutation verändert wird (werden). Daher wurden an transfizierten HEK-Zellen Single channel Analysen des KCNJ10/KCNJ16- und des KCNJ10/R137-Heteromers durchgeführt. Das KCNJ10/KCNJ16-Heteromer zeichnete sich unter physiologischen Bedingungen im Cell attached Modus durch eine hohe Leitfähigkeit und eine mäßige Offenwahrscheinlichkeit aus. Auch die in der Literatur beschriebenen charakteristischen Sublevel waren häufig zu sehen (vgl. Abbildung 31 A). Im exzidierten Patch konnte die Kanalaktivität durch die Zugabe von Pipettenlösung 4 mit pH 8,0 in das Bad deutlich erhöht werden (Abbildung 31 B).

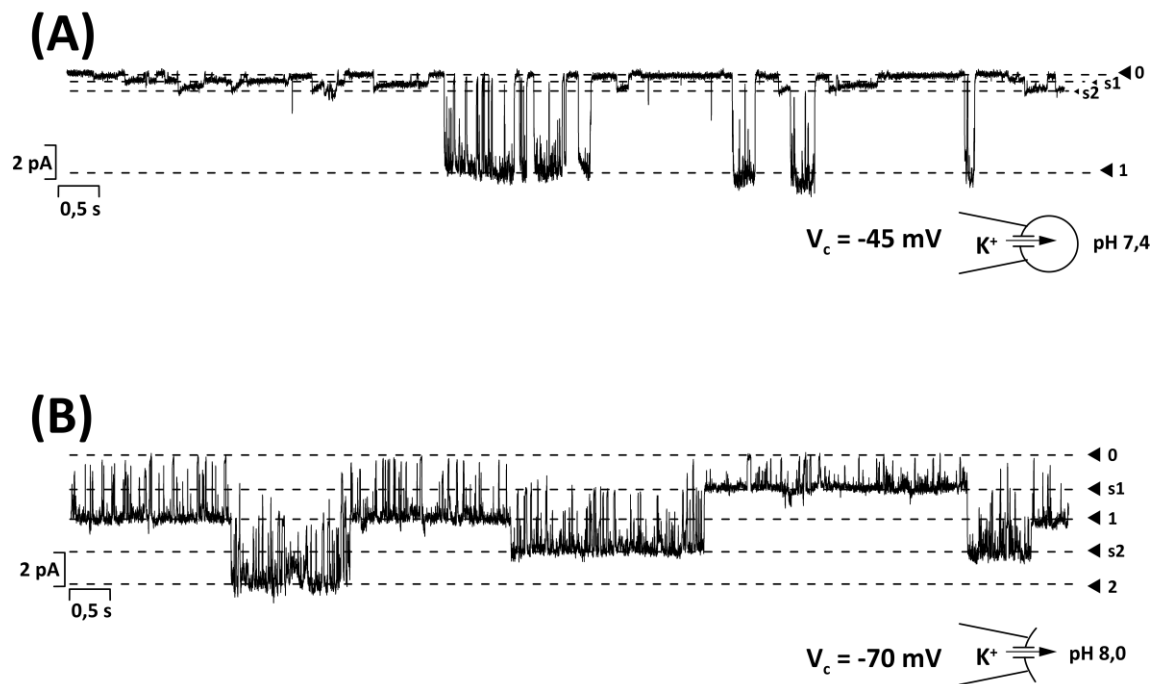


Abbildung 31: Typical Traces von KCNJ10/KCNJ16 Heteromeren

(A) Typical Trace des Wildtyp-Heteromers im Cell attached Modus unter physiologischem pH-Wert. Es ist ein aktiver Kanal mit zwei sehr kleinen Sublevels im Patch erkennbar. (B) Typical Trace des Wildtyp-Heteromers im Inside out Modus unter pH 8,0. In diesem Patch befanden sich zwei aktive Kanäle mit zwei Sublevels, deren Amplituden etwa $\frac{1}{4}$ und $\frac{3}{4}$ der Kanallevel bei vollständiger Kanalöffnung betragen.

Die pH-Abhängigkeit des KCNJ10/KCNJ16-Heteromers wurde anhand einer pH-Treppe im exzidierten Patch im Inside out Modus genauer untersucht, da Kir-Kanäle von intrazellulärer Seite über den pH-Wert reguliert werden. Dazu wurde Pipettenlösung 4 mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 8,0, 7,2, 6,5, 6,0 und 5,5) nacheinander ins Patchbad gegeben. Das Wildtyp-Heteromer war sehr pH-sensitiv und zeigte bereits ab pH 6,5 keinerlei Aktivität mehr (Abbildung 32).



Abbildung 32: pH-Abhängigkeit des KCNJ10/KCNJ16 Kanalheteromers

Basischer pH aktiviert das Wildtypheteromer. Unter physiologischen pH-Bedingungen ist die Aktivität etwas geringer als unter pH 8,0. Bereits bei einem pH von 6,5 war keine Kanalaktivität mehr zu sehen.

KCNJ10/R137C-Kanalheteromere zeigten ein völlig anderes Bild als die KCNJ10/KCNJ16-Heteromere. In einigen Fällen konnte im Cell attached Modus noch die Aktivität eines Kanals mit einer im Vergleich zu KCNJ10/KCNJ16 sehr geringen Leitfähigkeit beobachtet werden (Abbildung 33 A). Nach dem Exzidieren war im Inside Out Modus in aller Regel keine Kanalaktivität mehr feststellbar. Selbst unter einem hohen Klemmpotential und basischem pH (8,0) konnte keine Aktivität beobachtet werden (Abbildung 33 B). Da auch bei den niedrigeren pH-Werten keinerlei Kanalaktivität zu sehen war, wurde auf eine Darstellung von Traces der KCNJ10/R137C Heteromere unter verschiedenen pH-Werten verzichtet. Die pH-Abhängigkeit von KCNJ10/KCNJ16- und KCNJ10/R137C-Heteromeren ist in Abbildung 34 vergleichend dargestellt.

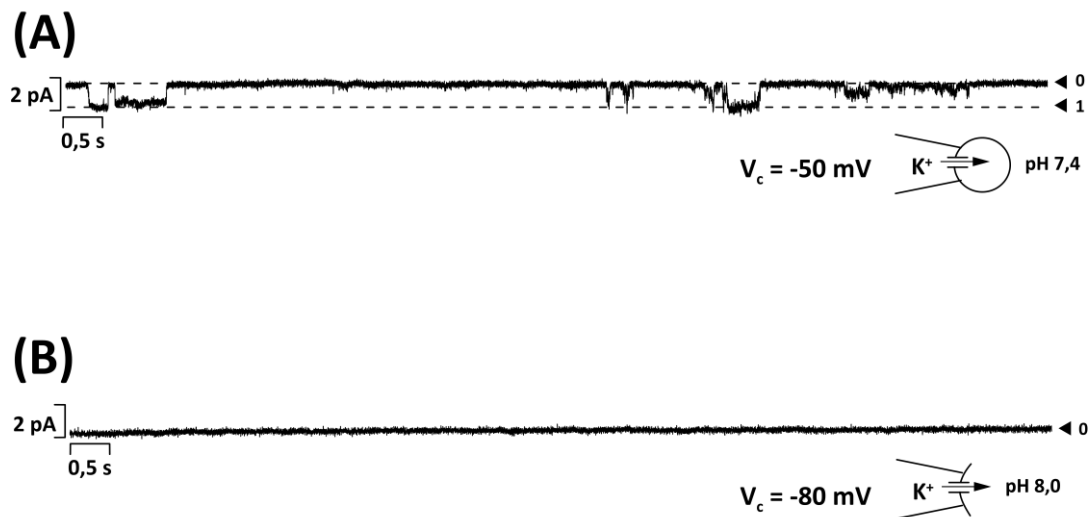


Abbildung 33: Typical Traces von KCNJ10/R137C-Heteromeren

(A): Typical Trace des KCNJ10/R137C-Heteromers im Cell attached Modus. Es ist nur ein Kanal mit sehr kleiner Amplitude und geringer Offenwahrscheinlichkeit im Patch. (B): Typical Trace des KCNJ10/R137C-Heteromers im Inside out Modus. Selbst unter pH 8,0 und einer relativ hohen Triebkraft von 80 mV war wie in diesem Trace in der Regel keinerlei Kanalaktivität feststellbar.

Hinweis: Die Klemmspannungen der gezeigten KCNJ10/R137C Traces unterscheiden sich leicht von den Klemmspannungen der gezeigten KCNJ10/KCNJ16 Traces. Die formal vom Verstärker ausgegebene Kommandospannung war zwar jeweils die gleiche, doch von dieser Klemmspannung muss noch das sogenannte Offsetpotential abgezogen werden, um die tatsächlich am Präparat anliegende Spannung zu ermitteln. Unter einem Offsetpotential versteht man eine Spannung, die nicht vom biologischen Präparat oder vom Kommandopotential herrührt, sondern an Übergängen innerhalb der Messkette Silberdraht - Pipettenlösung - Badlösung - Erdung entsteht. Das Offsetpotential führt damit zu Abweichungen zwischen dem am Verstärker angezeigten und dem tatsächlichen Potential von Zellmembran oder Patch. Daher wurde das Offsetpotential zu Beginn jedes Experiments bestimmt und für die Auswertung von der Kommandospannung abgezogen. Da sich das Offset-Potential im Laufe des Tages ändern kann, kommt es zu leichten Unterschieden in der „Nettospannung“ der gezeigten Traces.

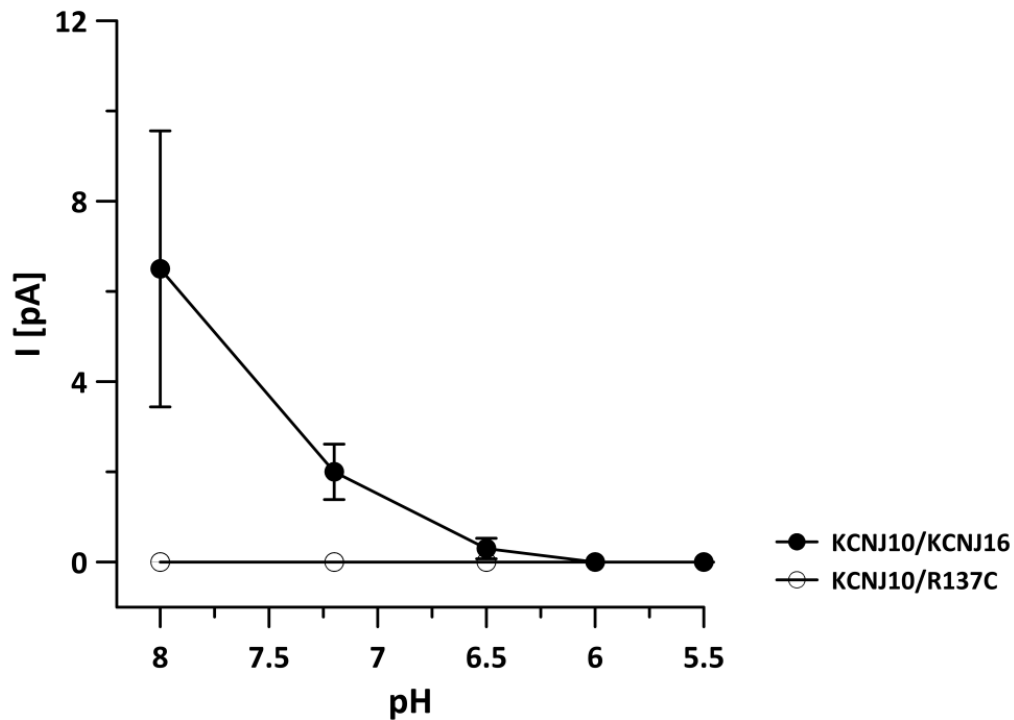


Abbildung 34: pH-Abhängigkeit von KCNJ10/KCNJ16- und KCNJ10/R137C-Heteromeren

KCNJ10/KCNJ16-Heteromere konnten durch basischen pH aktiviert werden und waren sehr pH-sensitiv. Bereits ab einem pH von 6,5 war keine Aktivität mehr feststellbar. Bei KCNJ10/R137C-Heteromeren war weder in sauren noch in physiologischen oder basischen pH-Bereichen Kanalaktivität zu beobachten.

4.2.6 Immunfluoreszenzfärbungen von transfizierten CHO-Zellen

Die KCNJ10/R137C-Heteromere zeigten in Patch-Clamp Experimenten eine verringerte Kanalfunktion im Vergleich zum KCNJ10/KCNJ16-Heteromer. Dies kann mehrere Ursachen haben: Zum einen ist es möglich, dass das mutierte KCNJ16-Protein noch mit KCNJ10 interagiert und normal in die Membran integriert, aber das Heteromer durch die Mutation in seiner Kanalfunktion beeinträchtigt wird. Zum anderen ist es denkbar, dass die mutierte KCNJ16-Untereinheit mit KCNJ10 interagiert, das Heteromer jedoch von der Zelle als fehlerhaft erkannt und abgebaut wird. Schließlich ist es auch denkbar, dass KCNJ16 R137C keine Interaktion mehr mit KCNJ10 eingeht und daher nicht mehr in der Zellmembran lokalisiert ist.

Um zu überprüfen, ob die Mutation R137C die Membrangängigkeit von KCNJ16 und/oder KCNJ10 beeinflusst, wurden immunhistochemische Färbungen an CHO-Zellen durchgeführt. Dazu wurden CHO-Zellen mit dem Wildtyp-Heteromer (Abbildung 35 A und B) bzw.

mit dem mutierten Heteromer (Abbildung 35 C und D) transfiziert und Färbungen mit antiKCNJ16- bzw. antiKCNJ10-Antikörpern durchgeführt. Eine Co-Färbung von KCNJ10 und KCNJ16 war nicht möglich, da beide Antikörper aus demselben Host (rabbit) stammten. Abbildung 35 A und B zeigt, dass bei der Cotransfektion von KCNJ10 mit KCNJ16 WT beide Proteine in der Zellmembran lokalisiert sind. Bei beiden Untereinheiten ist zudem ein intrazelluläres Signal zu erkennen. In Abbildung 35 C und D ist zu sehen, dass bei der Cotransfektion von KCNJ10 mit der KCNJ16-Mutante nur noch eine Färbung von KCNJ10 in der Zellmembran zu sehen ist, jedoch keine Lokalisation von der mutierten KCNJ16-Untereinheit in der Zellmembran erkennbar ist. Auch hier ist bei beiden Untereinheiten ein Signal im Intrazellularraum zu sehen.

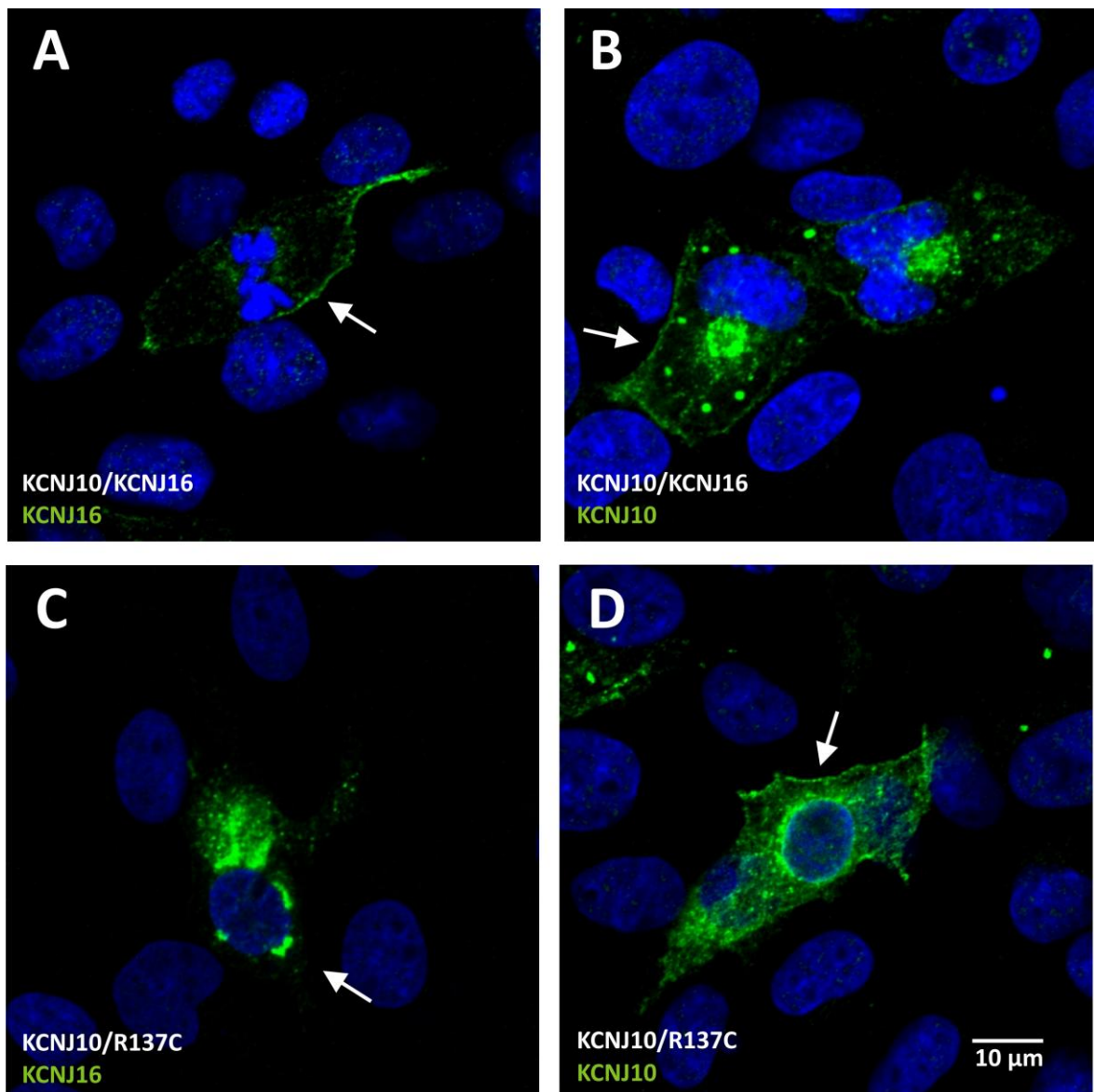


Abbildung 35: Immunfluoreszenzfärbung von transfizierten CHO-Zellen

(A): Mit KCNJ10/KCNJ16 transfizierte Zellen, gefärbt mit antiKCNJ16 (grün) und Hoechst-Farbstoff (Zellkerne, blau). KCNJ16 scheint überwiegend in der Zellmembran (weißer Pfeil) lokalisiert zu sein, im Zytosol ist nur wenig Signal erkennbar. **(B):** Mit KCNJ10/KCNJ16 transfizierte Zellen, gefärbt mit antiKCNJ10 (grün) und Hoechst-Farbstoff (blau). Eine Färbung von KCNJ10 ist in der Zellmembran erkennbar (Pfeil), doch auch im Zytosol ist vor allem in der Nähe des Zellkerns ein deutliches Signal zu erkennen. **(C):** Mit KCNJ10/R137C transfizierte Zellen, gefärbt mit antiKCNJ16 (grün) und Hoechst-Farbstoff (blau). In der Zellmembran (Pfeil) ist keine Färbung von KCNJ16 erkennbar, das Signal beschränkt sich auf intrazelluläre Strukturen. **(D):** Mit KCNJ10/R137C transfizierte Zellen, gefärbt mit antiKCNJ10. Sowohl in der Zellmembran (Pfeil) als auch intrazellulär ist eine Färbung von KCNJ10 zu sehen.

5. Diskussion

5.1 Expression von KCNJ16

Laut Literatur wird KCNJ16 beim Menschen in Niere, Pankreas, Nebenschilddrüse und Schilddrüse exprimiert [79]. Zudem wurde KCNJ16 bei Ratten in Milz, Leber, Nebennieren, Hoden und Gehirn nachgewiesen [45]. Bei Mäusen wird KCNJ16 laut dem EST-Profil der UniGene Datenbank von NCBI überwiegend in Niere und in geringerem Ausmaß auch in Rückenmark, Innenohr, Gehirn und Magen exprimiert. Mit Hilfe von Real-Time PCR Experimenten und immunhistochemischen Färbungen wurde daher zunächst die Expression von KCNJ16 in verschiedenen Geweben von KCNJ16^{+/+} Mäusen untersucht.

Die Real-Time PCR Daten von KCNJ16^{+/+} Mäusen bestätigten eine starke Expression von KCNJ16 in der Niere. In Gehirn und Magen war das KCNJ16-Gen vergleichsweise schwach exprimiert. Auch in der Schilddrüse der Wildtypmäuse ließ sich KCNJ16 mRNA nachweisen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass KCNJ16 besonders für die Nierenfunktion wichtig ist. Somit würde man bei einem Knockout von KCNJ16 vor allem einen renalen Phänotyp erwarten. Doch auch in den anderen Geweben, in denen KCNJ16 in geringerem Ausmaß exprimiert wird, kann der Ausfall der Untereinheit zu pathologischen Prozessen führen.

Die Lokalisation von KCNJ16 in der Niere wurde anhand von Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt. Daten aus anderen Publikationen zeigten bereits, dass KCNJ16 vor allem im distalen Nephron lokalisiert ist [9, 68, 69], es wurde jedoch von mehreren Arbeitsgruppen auch eine Expression im proximalen Tubulus beschrieben [9, 84, 85]. Anhand der hier gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen ließ sich nur eine Expression von KCNJ16 in distalen Tubulussegmenten feststellen. Dort ist KCNJ16 in der basolateralen Membran lokalisiert. Dass im proximalen Tubulus keine Färbung zu sehen war, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass KCNJ16 nur in sehr geringer Menge im proximalen Tubulus exprimiert ist und der in dieser Arbeit verwendete Antikörper nicht sensitiv genug war, um KCNJ16 dort zu detektieren. Zum anderen könnten die Daten in der Literatur, die eine KCNJ16-Expression in per Mikrodissektion gesammelten proximalen Tubuli zeigen, verfälscht sein. Dies kann der Fall sein, wenn das mRNA-Signal von KCNJ16 im proximalen Tubulus durch eine Verunreinigung der gesammelten proximalen Tubuli mit distalen Tubulus-

segmenten verursacht wurde. Ferner könnten die Unterschiede jedoch auch durch Spezies-spezifische oder sogar Mausstamm-spezifische Unterschiede bedingt sein.

5.2 Phänotyp der KCNJ16 Knockoutmaus

In den Publikationen von Paulais *et al.* bzw. Trapp *et al.* wurde bereits eine KCNJ16-Knockoutmaus bezüglich ihres respiratorischen und renalen Phänotyps untersucht [93, 94]. Da diese Veröffentlichungen jedoch erst im Laufe dieser Arbeit erschienen und sich zudem der genetische Background des hier verwendeten Knockoutmausmodells von dem des bereits publizierten Mausmodells unterschied, wurde auch in dieser Arbeit eine umfassende Phänotypisierung der KCNJ16^{-/-} Maus vorgenommen. In der Tat unterschieden sich die hier gezeigten Ergebnisse in etlichen Punkten von den bereits publizierten Daten.

Paulais *et al.* stellten bei ihren KCNJ16 Knockoutmäusen zum Beispiel ein deutlich verringertes Körpergewicht im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren fest. Im Gegensatz zu den Mäusen von Paulais *et al.* entwickelten sich unsere KCNJ16^{-/-} Mäuse völlig unauffällig und zeigten kein vermindertes Körpergewicht oder sonstige augenscheinliche morphologische Veränderungen. Diese diskrepanten Befunde sind vermutlich auf die Verwendung zweier unterschiedlicher Mäusestämme zurückzuführen. Während Paulais *et al.* ihre KCNJ16 Knockoutmaus über mehr als 10 Generationen mit C57Bl6/6J Mäusen rückkreuzten, um einen isogenetischen Mäusestamm zu erzeugen [100], wurden für diese Arbeit KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäuse in einem gemischten SV129/C57Bl6 Background verwendet. Allein dieser Unterschied im genetischen Hintergrund kann bekanntermaßen zu unterschiedlich ausgeprägten Phänotypen führen [101]. Dass schon die Verwendung unterschiedlicher Mäusestämme zu Differenzen in den Ergebnissen führen kann, verdeutlicht außerdem, dass die aus Tierexperimenten gewonnenen Daten nur begrenzt auf den Menschen übertragen werden können und daher immer mit kritischem Auge zu betrachten sind.

Trotzdem liefern Tierexperimente wertvolle Anhaltspunkte über die Bedeutung einzelner Proteine. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher umfangreiche Analysen an Blut- und Urinproben von KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen durchgeführt. Die Arbeiten von Paulais *et*

al. und die Daten über die Patientin mit der KCNJ16-Mutation zeigten bereits, dass KCNJ16 für den Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt wichtig ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigten dies. Vor allem in den ersten Tagen der Nierenentwicklung scheint der Knockout von KCNJ16 besonders drastische Folgen zu haben: Die renale Ausscheidung fast aller Elektrolyte war bei neugeborenen KCNJ16^{-/-} Mäusen pathologisch verändert. Im Laufe der Nierenreifung verschwanden jedoch fast alle Unterschiede. Es könnte daher sein, dass KCNJ16 in den ersten Lebenstagen in der Niere stärker exprimiert wird als in der späteren Entwicklung und/oder anfangs Funktionen ausübt, die im Laufe der Nierenreifung von anderen Kaliumkanälen übernommen werden. Es ist jedoch genauso denkbar, dass sich in älteren Tieren Kompensationsmechanismen ausbilden, die die Störungen in der Elektrolyt-ausscheidung ausgleichen. Für letztere Theorie sprechen die Befunde aus den Inulin-Clearance Messungen, denn unter Narkose mit Isofluran zeigten die adulten KCNJ16^{-/-} Mäuse plötzlich wieder einen erhöhten Verlust verschiedener Elektrolyte über den Urin. Möglicherweise schwächte die Anästhesie Kompensationsmechanismen ab, die am wachen Tier knockoutbedingte Defekte ausgleichen. Ob und auf welchem Wege tatsächlich eine Kompensation der Elektrolytverluste über den Urin stattfindet, müsste in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

Bei adulten KCNJ16^{-/-} Mäusen in wachem Zustand war nur die PO₄³⁻-Ausscheidung signifikant erniedrigt. Paulais *et al.* stellten jedoch bei der Untersuchung von Urinproben, die in metabolischen Käfigen gesammelt wurden, einen renalen Verlust von K⁺, Ca²⁺ und Mg²⁺ bei adulten KCNJ16^{-/-} Mäusen fest. Möglicherweise ist der renale Phänotyp bei der Verwendung eines reinen C57Bl6 Backgrounds ausgeprägter. Die Unterschiede in den Befunden können jedoch auch in der unterschiedlichen Art der Probengewinnung und der Verwendung unterschiedlicher Analysegeräte begründet sein. Da unsere KCNJ16^{-/-} Mäuse jedoch kurz nach der Geburt und unter Anästhesie ebenfalls eine signifikant erhöhte Ausscheidung von Ca²⁺ und Mg²⁺ und eine tendenziell erhöhte K⁺-Ausscheidung zeigten, ist der unterschiedliche genetische Background am wahrscheinlichsten für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich. Unsere KCNJ16^{-/-} Mäuse zeigten ferner unter Anästhesie bzw. kurz nach der Geburt eine signifikant erhöhte Exkretion von Na⁺ und Cl⁻, wohingegen die KCNJ16^{-/-} Mäuse von Paulais *et al.* eine normale NaCl-Ausscheidung über den Urin zeigten. Dafür beschrieben die Autoren eine Polyurie und eine erniedrigte Urinosmolalität bei ihren

KCNJ16 Knockoutmäusen, wohingegen unsere KCNJ16^{-/-} Mäuse keinerlei Probleme in der Harnkonzentrierung aufwiesen. Wie bereits erwähnt, haben renale Elektrolytverluste aus osmotischen Gründen meist eine erhöhte Wasserausscheidung zur Folge. Da die KCNJ16^{-/-} Mäuse von Paulais *et al.* viele Elektrolyte über den Urin verlieren, ist bei diesen Mäusen das Vorhandensein einer Polyurie nicht verwunderlich. Unsere KCNJ16^{-/-} Mäuse zeigten bis auf eine signifikant erniedrigte PO₄³⁻ Ausscheidung keine Auffälligkeiten in der renalen Ausscheidung, daher ist es auch nicht überraschend, dass die Fähigkeit zur Harnkonzentrierung bei unseren Tieren unbeeinträchtigt ist. Auch diese unterschiedlichen Befunde sind wahrscheinlich der Verwendung unterschiedlicher Mäusestämme geschuldet.

In der Publikation von Paulais *et al.* wurde außerdem eine unterschiedliche Reaktion von KCNJ16 Wildtyp- und Knockoutmäusen auf eine kurzzeitige Applikation von HCT beschrieben. Unter Kontrollbedingungen verloren die Mäuse K⁺, Ca²⁺ und Mg²⁺ über den Urin und zeigten eine hypokaliämische hyperchloriämische Azidose. Nach der Applikation von HCT zeigten die KCNJ16^{-/-} Mäuse einen gegenüber den KCNJ16^{+/+} Mäusen signifikant erhöhten Anstieg in der Na⁺-Exkretion, wohingegen die Caliciurie der KCNJ16^{-/-} Mäuse durch HCT normalisiert wurde. Die Autoren schlossen aus diesen Daten, dass das Fehlen von KCNJ16 zu einer gesteigerten NaCl-Resorption im DCT führt, wodurch die Na⁺-Rückresorption im proximalen Tubulus kompensatorisch herunterreguliert wird und in Folge dessen auch die parazelluläre Ca²⁺-Rückresorption abnimmt. Durch diesen Kompensationsmechanismus ist laut den Autoren die Hyperresorption von NaCl unter Normalbedingungen nicht sichtbar. Wird jedoch der NCC im distalen Tubulus durch HCT gehemmt, würde die daraus resultierende erhöhte Na⁺-Exkretion der Knockouttiere für eine gesteigerte Resorption im DCT sprechen.

Um die Reaktion unserer KCNJ16^{-/-} Mäuse auf HTC zu testen, wurden den KCNJ16^{+/+} und KCNJ16^{-/-} Mäusen während der GFR-Experimente daher ebenfalls Diuretika appliziert. Um eine Kompensation des Salzverlustes, der durch HTC ausgelöst wird, über das Sammelrohr zu verhindern, wurde zudem zeitgleich Amilorid verabreicht. Durch die Diuretika wurde die unter Kontrollbedingungen bei den KCNJ16^{-/-} Mäusen signifikant erhöhte renale Ausscheidung von Na⁺, Cl⁻ und Mg²⁺ normalisiert, die Caliciurie blieb hingegen bestehen. Diese Daten sprechen somit eher dafür, dass ein Fehlen der KCNJ16 Untereinheit zu einer

verminderten Rückresorption im DCT führen, nicht zu einer Hyperresorption. Die These von Paulais *et al.* kann daher anhand dieser Befunde nicht bestätigt werden.

Neben den Urinanalysen wurden auch umfangreiche Messungen an Plasmaproben der Mäuse vorgenommen. Die Plasmaanalysen unserer KCNJ16^{-/-} Mäusen ergaben trotz der erhöhten PO₄³⁻-Ausscheidung einen normalen PO₄³⁻-Spiegel im Plasma. Phosphat ist ein wichtiger Bestandteil vieler organischer Verbindungen. Es wird z. B. für Phospholipide, Nukleinsäuren und Nukleotide benötigt. Die Rückresorption von PO₄³⁻ findet im proximalen Tubulus über den NaPiIIa Symporter statt. Daher könnte ein renaler PO₄³⁻-Verlust dafür sprechen, dass KCNJ16 tatsächlich im proximalen Tubulus exprimiert wird und der renale Verlust von PO₄³⁻ in einer Transportstörung im proximalen Tubulus begründet ist. Dass der PO₄³⁻-Spiegel im Plasma von KCNJ16^{-/-} Mäusen trotzdem nicht erniedrigt ist, liegt möglicherweise an einer vermehrten PO₄³⁻-Resorption im Darm. Die Plasmaanalysen ergaben auch einen gestörten Kaliumhaushalt der KCNJ16^{-/-} Mäuse. Da der Plasmakaliumspiegel von KCNJ16^{-/-} Mäusen gegenüber dem von KCNJ16^{+/+} Mäusen signifikant erniedrigt war, könnte man eine vermehrte K⁺-Exkretion über den Urin erwarten. Dies war jedoch wie erwähnt nicht der Fall. Es zeichnete sich zwar sowohl am wachen als auch am anästhesierten Tier eine leicht erhöhte renale K⁺-Ausscheidung bei den KCNJ16^{-/-} Mäusen ab, diese war jedoch nicht signifikant verändert gegenüber der K⁺-Ausscheidung von KCNJ16^{+/+} Mäusen. Der Befund der Hypokaliämie deckt sich mit den Resultaten von Paulais *et al.* Die weiteren Plasmawerte zeigten jedoch wieder Differenzen. Während Paulais *et al.* eine Hyperchloriämie feststellten, waren die Cl⁻-Werte im Plasma unserer KCNJ16^{-/-} Mäuse unauffällig. Dafür zeigten unsere KCNJ16^{-/-} Mäuse eine leichte Hypermagnesiämie, wohingegen der Plasmawert von Mg²⁺ bei den Knockoutmäusen von Paulais *et al.* keinen signifikanten Unterschied zu ihren Wildtypmäusen aufwies und tendenziell eher niedriger lag. Trotz normaler Ausscheidung von SO₄²⁻ über den Urin war auch der SO₄²⁻ Spiegel im Plasma unserer KCNJ16^{-/-} Mäuse signifikant erniedrigt. Die Tatsache, dass die Urindaten und Plasmadaten unserer KCNJ16^{-/-} Mäuse in einigen Punkten nicht zusammenzupassen scheinen (z. B. Hypokaliämie trotz normaler K⁺-Ausscheidung über den Urin) macht deutlich, wie komplex und vielschichtig der Elektrolythaushalt reguliert wird. Zahlreiche Hormone und weitere Faktoren sind an der Elektrolythomöostase beteiligt. Ob und auf welche Weise die

hier untersuchten KCNJ16^{-/-} Mäuse Störungen im Elektrolythaushalt kompensieren können, müsste daher in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Hinsichtlich des Säure-Basen-Haushaltes ähneln die Daten unserer KCNJ16^{-/-} Mäuse den Daten der KCNJ16^{-/-} Mäuse von Paulais *et al.* Beide Knockoutmausmodelle wiesen eine metabolische Azidose auf. Dass ein Fehlen der KCNJ16 Untereinheit unabhängig vom genetischen Hintergrund zu Störungen im Säure-Basen-Haushalt führt, kann somit als wahrscheinlich angesehen werden. Blutdruck, Blutgaswerte und GFR waren jedoch sowohl bei der hier untersuchten als auch bei der bereits publizierten KCNJ16^{-/-} Maus unauffällig. Auch der Aldosteronspiegel war bei beiden Knockoutmausmodellen unverändert gegenüber den Vergleichstieren. Ein aktiviertes RAAS als möglicher Kompensationsmechanismus scheidet damit aus.

Paulais *et al.* postulierten in ihrer Arbeit über den renalen Phänotyp der KCNJ16^{-/-} Maus, wie vorhin erwähnt, eine gesteigerte Rückresorption im DCT. Laut den Autoren könnte der Ausfall der KCNJ16 Untereinheit zu einer (vermehrten) Bildung von KCNJ10-Homomeren in der Niere führen, die eine weit geringere pH-Sensitivität aufweisen als die Heteromere. Die KCNJ10-Homomere würden durch die fehlende pH-Regulation der Na⁺-K⁺-ATPase mehr Kaliumionen zur Verfügung stellen als die KCNJ10/KCNJ16 Heteromere und somit die Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase steigern. Dies würde eine Hyperresorption von Elektrolyten im DCT zur Folge haben und zu Symptomen führen, die sich von den Symptomen bei EAST-Patienten unterscheiden. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten passen jedoch in vielerlei Hinsicht nicht zu der von Paulais *et al.* aufgestellten Theorie. Vor allem die Ausscheidungsdaten beim anästhesierten Tier sprechen eher für eine negative Beeinträchtigung als für eine Steigerung in der Rückresorption. Um zu klären, ob die vielen Differenzen in den hier gezeigten Ergebnissen und den Daten von Paulais *et al.* tatsächlich nur auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Mäuse zurückzuführen sind, müsste unser KCNJ16^{-/-} Modell über mehrere Generationen in einen reinen C57Bl6 Background rückgekreuzt werden. Diese Rückkreuzungen laufen bereits, so dass in Zukunft Daten von diesen Mäusen erhoben werden können.

5.3 Auswirkungen der KCNJ16 Mutation R137C

Patch-Clamp Experimente zeigten, dass alle bislang bekannten Mutationen im KCNJ10-Gen (zum Teil erhebliche) Funktionsbeeinträchtigungen sowohl des KCNJ10-Homomers als auch des KCNJ10/KCNJ16 Heteromers zur Folge haben. Unabhängig von der Lage der Mutation leiden daher alle EAST-Patienten an renalen Salzverlusten. Auch die bisher einzige bekannte Patientin mit EAST-ähnlichen Symptomen, die eine Mutation im KCNJ16 Gen trägt, leidet an erhöhten Elektrolytverlusten über den Urin. Bei dieser Patientin wurde die Missense Mutation R137C identifiziert, die sehr nahe an der P-Region des Proteins liegt (vgl. Abbildung 8). Während in konventionellen KCNJ16^{-/-} Mäusen die Untereinheit KCNJ16 völlig fehlt, um KCNJ10/KCNJ16-Heteromere zu bilden, könnte die mutierte KCNJ16 Untereinheit bei der Patientin möglicherweise noch zur Heteromerisierung in der Lage sein. Um dies zu überprüfen, wurden HEK- und CHO-Zellen mit KCNJ10 Wildtyp und KCNJ16 Wildtyp bzw. KCNJ16 R137C cotransfiziert und elektrophysiologisch mit Hilfe der Patch-Clamp Technik untersucht. Whole cell Messungen zeigten, dass das Membranpotential von Zellen, die mit KCNJ10/R137C transfiziert waren, etwas unter dem Membranpotential der Zellen lag, die mit KCNJ10/KCNJ16 transfiziert waren. Das Membranpotential von KCNJ10/R137C lag dennoch deutlich über dem von scheintransfizierten Zellen. Unter Zugabe von Ba²⁺ zeigten KCNJ10/KCNJ16 und KCNJ10/R137C eine deutliche Depolarisation. Diese Daten sprechen eindeutig dafür, dass in den Zellen, die mit KCNJ10/R137C transfiziert waren, aktive K⁺-Kanäle exprimiert waren. Auch der Strom durch diese Kanäle lag noch deutlich über dem Strom, den scheintransfizierte Zellen zeigten, jedoch unter dem Strom, den das Wildtyp-Heteromer erzeugte. Anhand der Whole cell Ergebnisse lässt sich jedoch nicht sagen, ob in Zellen, die mit KCNJ10/R137C transfiziert waren, funktionsbeeinträchtigte KCNJ10/R137C-Heteromere vorlagen oder ob diese Zellen mit KCNJ10 Homomeren „kontaminiert“ waren. KCNJ10-Homomere sind nur sehr schwach einwärtsgerichtend und haben ein ähnlich hohes Membranpotential wie KCNJ10/KCNJ16-Heteromere [69]. Das Membranpotential und der Stromfluss über die Zellmembran von Zellen, die mit KCNJ10/R137C transfiziert waren, hätten also durch KCNJ10-Homomere bedingt sein können. Um dies zu klären, wurden zusätzlich zu den Whole cell Messungen Einzelkanalanalysen im Cell attached und Inside out Modus durchgeführt.

KCNJ10/KCNJ16-Heteromere zeigten in den Single channel Messungen eine sehr hohe Leitfähigkeit, die charakteristischen Sublevel und eine hohe pH-Sensitivität. Damit entsprachen die beobachteten Eigenschaften von KCNJ10/KCNJ16 den in der Literatur beschriebenen Charakteristika [70–72, 88]. Das Expressionslevel der KCNJ10/KCNJ16-Heteromere war so hoch, dass nur selten ein „stiller“ Patch ohne aktive Kanäle zu beobachten war. Bei Zellen, die mit KCNJ10/R137C transfiziert waren, ergab sich hingegen ein völlig anderes Bild. In der großen Mehrzahl der Fälle war der Patch unter der Pipette still und zeigte keine aktiven Kanäle. Nur selten waren in der Cell attached Konfiguration aktive Kanäle zu sehen. Deren Leitfähigkeit war jedoch deutlich geringer als die der KCNJ10/KCNJ16-Heteromere. Auch im Inside out Modus konnte selbst bei hoher Klemmspannung und unter basischem pH-Wert keine Kanalaktivität provoziert werden. Diese Daten sprechen dafür, dass die mutierte KCNJ16 Untereinheit keine funktionellen Heteromere mehr mit KCNJ10 bilden kann. Die Restaktivität, die bei KCNJ10/R137C in den Whole cell Experimenten gemessen wurde, stammt mit hoher Wahrscheinlichkeit von KCNJ10 Homomeren. Für die Cotransfektion wurde zwar immer ein Verhältnis von 1:10 (KCNJ10:KCNJ16 WT bzw. R137C) gewählt, dennoch ist eine Bildung von KCNJ10-Homomeren nicht auszuschließen. Die in Single channel Experimenten selten beobachteten Kanäle könnten zumindest zum Teil KCNJ10 Homomere sein, zum Teil könnten es auch endogene Kanäle gewesen sein. Durch die relativ geringe Plasmidmenge von KCNJ10, die für die Transfektion verwendet wurde, war vermutlich die Wahrscheinlichkeit sehr gering, (aktive) KCNJ10-Homomere im Patch zu haben, weshalb der Patch meist still war. Um Gewissheit darüber zu bekommen, ob der Reststrom und das Membranpotential von CHO-Zellen, die mit KCNJ10/R137C transfiziert waren, von KCNJ10 Homomeren stammten, müssten Messungen an CHO-Zellen durchgeführt werden, die nur mit KCNJ10 transfiziert wurden. Dazu müsste die für die Transfektion verwendete KCNJ10 Konzentration genau der Konzentration entsprechen, die für die Cotransfektion eingesetzt wurde. Diese Messungen wurden noch nicht in ausreichender Anzahl durchgeführt, sind aber in Arbeit. Die bisherigen Ergebnisse sprechen jedoch für die Hypothese, dass der bei KCNJ10/R137C beobachtete Strom und das hyperpolarisierte Membranpotential eigentlich von KCNJ10-Homomeren stammen.

Die gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen an transfizierten CHO-Zellen bekräftigten zudem die Vermutung, dass das mutierte KCNJ16 Protein keine funktionellen Kanäle mehr mit KCNJ10 bildet. In den CHO-Zellen, die mit KCNJ10 und KCNJ16 transfiziert waren, war eine Expression sowohl von KCNJ10 als auch von KCNJ16 in der Zellmembran zu erkennen. Bei den Zellen, die mit KCNJ10 und R137C transfiziert wurden, war zwar die KCNJ10-Expression in der Membran scheinbar unbeeinträchtigt. KCNJ16 war jedoch nur noch in intrazellulären Strukturen zu sehen, wobei der Hauptteil des überexprimierten Proteins sich vermutlich im Endoplasmatischen Reticulum befindet. Es ist jedoch auch vorstellbar, dass KCNJ16 nach wie vor mit KCNJ10 interagiert und einen dominant-negativen Effekt ausübt. Da anhand der Immunfluoreszenzfärbungen keine quantitative Aussage über die KCNJ10-Expression in der Membran gemacht werden kann, ist nicht auszuschließen, dass durch die mutierte KCNJ16-Untereinheit die KCNJ10-Expression an der Zelloberfläche vermindert wird. Die noch nicht veröffentlichten Expressionsstudien von Schlingmann *et al.* sprechen dafür, dass die KCNJ16-Mutation R137C das Membrantrafficking von KCNJ10 deutlich vermindert. In Patch-Clamp Experimenten ist jedoch möglicherweise immer noch genügend KCNJ10 in der Membran lokalisiert, um für das beobachtete Membranpotential und den Strom bei Cotransfektion von KCNJ10 mit R137C verantwortlich zu sein.

5.4 Vergleich der Ergebnisse mit der klinischen Symptomatik beim Menschen

Bereits die Verwendung unterschiedlicher genetischer Hintergründe führt bei KCNJ16^{-/-} Mäusen zu sehr unterschiedlich ausgeprägten Phänotypen. Beide Mausmodelle unterschieden sich wiederum in wesentlichen Teilen von der klinischen Symptomatik der EAST-Patienten und der Patientin mit der KCNJ16-Mutation (vgl. Tabelle 3). Alle Patienten mit Mutationen im KCNJ10 oder KCNJ16 Gen zeigen einen sehr ähnlichen renalen Phänotyp, der vor allem durch eine Hypomagnesiämie und eine hypokaliämische metabolische Alkalose gekennzeichnet ist. Mit Ausnahme der Hypokaliämie hat der renale Phänotyp beider Mausmodelle kaum etwas mit den humanen Befunden gemeinsam. KCNJ16^{-/-} Mäuse sind daher scheinbar keine geeigneten Modelle für Erkrankungen, die das KCNJ10/KCNJ16-Kanalheteromer betreffen. In einer konventionellen KCNJ16-Knockoutmaus fehlt das Gen und somit auch das Protein vollständig. Bei einer Mutation wird jedoch meist noch ein

fehlerhaftes Protein gebildet, welches seinerseits für die Symptome der Erkrankung verantwortlich sein kann. Bei fast allen bekannten KCNJ10-Mutationen wird noch ein funktionsbeeinträchtigtes Kanalheteromer gebildet, daher ist auch bei der KCNJ16-Mutation eine Interaktion mit KCNJ10 denkbar. Die Ähnlichkeit der renalen Symptomatik von EAST-Patienten mit den Symptomen der KCNJ16-Patientin spricht sogar sehr für eine Interaktion des mutierten KCNJ16 Proteins mit KCNJ10, die zu gestörten Rückresorptionsprozessen im DCT führt.

Wenn auch die KCNJ16^{-/-} Mäuse nicht geeignet sind, um die genauen Krankheitsmechanismen bei EAST-Patienten oder „KCNJ16-Patienten“ zu untersuchen, so liefern sie dennoch wertvolle Hinweise über die Bedeutung der KCNJ16 Untereinheit. In jedem Falle zeigt sich bei einem Knockout der KCNJ16-Untereinheit eine Störung im Elektrolyt- und im Säure-Basen-Haushalt, die sich je nach genetischem Hintergrund auf unterschiedliche Art und Weise äußert. Diese Ergebnisse und die Patientendaten liefern den Beweis dafür, dass nicht nur die KCNJ10-Untereinheit sondern ebenso KCNJ16 für die Rückresorptionsvorgänge in der Niere eine entscheidende Rolle spielt.

	KCNJ16 ^{-/-} (129/SvEv-C57BL/6)	KCNJ16 ^{-/-} (C57BL/6) (Paulais <i>et al.</i>)	Patientin mit KCNJ16- Mutation	EAST- Patienten
Plasma				
Na ⁺	o. B.	o. B.	o. B.	o. B.
Cl ⁻	o. B.	↑	↓	↓
K ⁺	↓	↓	↓	↓
Ca ²⁺	o. B.	o. B.	o. B.	o. B.
Mg ²⁺	↑	o. B.	↓	↓
pH	↓	↓	↑	↑
HCO ³⁻	↓	↓	↑	↑
pCO ₂	o. B.	o. B.	?	?
aktiviertes RAAS	-	-	+	+
Urin				
Na ⁺	o. B.	o. B.	o. B.	(↑)
Cl ⁻	o. B.	o. B.	?	?
K ⁺	o. B.	↑	↑	↑
Ca ²⁺	o. B.	↑	↓	↓
Mg ²⁺	o. B.	↑	↑	↑
Polyurie	-	+	+	-
Allgemeines				
Ataxien	-	-	-	+
Epilepsie	-	-	-	+
Taubheit	?	?	+	+
Wachstums- störungen	-	+	+	+

Tabelle 3: Vergleich von murinen und humanen Phänotypen

↑: Signifikant erhöht, (↑): tendenziell erhöht, ↓: Signifikant erniedrigt, +: vorhanden, -: nicht vorhanden, ?: nicht untersucht bzw. keine Daten bekannt, o. B.: ohne Befund

5.5 Ausblick

Auch wenn inzwischen einiges über die Funktion der KCNJ16 Untereinheit bekannt ist, sind noch viele weitere Untersuchungen notwendig, um die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von KCNJ16 im Detail aufzuklären. Zum einen ist es von Interesse, welche Rolle KCNJ16 während der Nierenreifung spielt und warum in jungen KCNJ16^{-/-} Mäusen noch so viele Störungen in der renalen Exkretion bestehen, die in adulten Tieren verschwunden sind. Die Aufklärung der Bedeutung von KCNJ16 in der Nierenentwicklung und der möglichen Kompensationsmechanismen im adulten Tier ist noch geplant. Zudem laufen derzeit Rückkreuzungen unserer KCNJ16^{-/-} Mäuse mit C57BL/6 Mäusen, um den gleichen genetischen Hintergrund zu erreichen wie bei den KCNJ16^{-/-} Mäusen von Paulais *et al.* Wenn dann bei den rückgekreuzten Mäusen dieselben Befunde erhoben werden wie sie von Paulais *et al.* publiziert wurden, wäre dies der endgültige Beweis für den Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die phänotypische Ausprägung des KCNJ16-Knockouts. Außerdem soll anhand verschiedener Diäten (z. B. durch eine Niedrig-Na⁺- oder Niedrig-K⁺-Diät) untersucht werden, ob unter dieser Belastung der renale Phänotyp bei den KCNJ16^{-/-} Mäusen deutlicher zu Tage tritt.

Da KCNJ16 auch in einigen anderen Geweben - wie zum Beispiel Magen und Schilddrüse - exprimiert wird, soll in Zukunft auch noch die Auswirkung des Knockouts auf diese Organe untersucht werden. Besonders interessant sind dabei auch die Konsequenzen des Knockouts von KCNJ16 für das Hörvermögen, da die KCNJ16-Patientin an einer Innenohrschwerhörigkeit leidet. Für diese Untersuchungen sollen Hörtests an KCNJ16^{-/-} Mäusen vorgenommen werden.

Bezüglich der KCNJ16-Mutation R137C gilt es noch abschließend zu klären, inwieweit die mutierte KCNJ16-Untereinheit noch mit KCNJ10 interagieren kann und inwiefern KCNJ10 dadurch gegebenenfalls beeinträchtigt wird. Dazu sind weitere Patch-Clamp Experimente und Expressionsstudien geplant. Es gibt also noch zahlreiche offene Fragen im Zusammenhang mit der Funktion von KCNJ16, die noch geklärt werden müssen.

6. Zusammenfassung

Die Rückresorptionsprozesse in der Niere und ihre genaue Regulation sind essentiell für die Wasser- und Elektrolythomöostase sowie die Regulation des Blutdrucks. Auch wenn im distalen Konvolut (DCT) nur ein relativ kleiner Anteil an Elektrolyten rückresorbiert wird, führen Störungen in diesem Segment dennoch zu deutlichen Krankheitssymptomen, wie man an Gitelman-, Bartter Typ III- und EAST-Patienten sehen kann. EAST-Patienten leiden zum Beispiel unter Hypomagnesiämie und einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose. Das EAST-Syndrom ist durch Mutationen im KCNJ10-Gen bedingt, das für die Kaliumkanaluntereinheit KCNJ10 codiert. KCNJ10 ist in der Niere stark exprimiert und bildet dort heteromere Kaliumkanäle mit der Untereinheit KCNJ16. Die KCNJ10/KCNJ16-Heteromere sind für das K^+ -Recycling über die basolaterale Membran im distalen Nephron zuständig, so dass der Na^+ - K^+ -ATPase ständig ausreichend K^+ für weitere Pumpzyklen zur Verfügung steht. Die durch eine Mutation von KCNJ10 verursachten Funktionsstörungen im KCNJ10/KCNJ16-Kanal führen bei EAST-Patienten zu einer Störung im K^+ -Recycling und damit zu renalen Elektrolytverlusten.

Lange Zeit war nicht viel über die genaue Bedeutung der KCNJ16-Untereinheit bekannt. Daher war es Ziel dieser Arbeit, anhand eines KCNJ16^{-/-} Mausmodells die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von KCNJ16 näher zu untersuchen. Dabei sollte vor allem die Auswirkung des Knockouts auf die Nierenfunktion untersucht werden. 2011 erschienen schließlich von den Arbeitsgruppen um Teulon und Tucker zwei Publikationen über eine KCNJ16^{-/-} Maus, die sowohl einen respiratorischen als auch einen renalen Phänotyp aufwies. Der renale Phänotyp äußerte sich in einer Hypokaliämie und Verlusten von K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} über den Urin. Zudem wurde bei den KCNJ16^{-/-} Mäusen eine metabolische Azidose festgestellt. Da sich die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Knockoutmaus in ihrem genetischen Hintergrund von der bereits publizierten KCNJ16^{-/-} Maus unterschied und die beiden Publikationen zudem erst im Verlauf dieser Arbeit erschienen sind, wurde dennoch eine umfassende Phänotypisierung vorgenommen. Dazu wurde zunächst die Expression von KCNJ16 in Wildtypmäusen in verschiedenen Geweben mit Hilfe von Real-Time PCR und immunhistochemischen Färbungen näher untersucht. Dann wurde über die Analyse von Urin- und Plasmaproben die Auswirkung des Knockouts auf die Nierenfunktion untersucht. Es wurden auch Messungen des Blutdrucks, der GFR und der Blutgase durchgeführt.

Die Expressionsanalysen ergaben, dass KCNJ16 bei Wildtypmäusen besonders stark in der Niere exprimiert wird, doch auch in anderen Organen wie Schilddrüse, Magen und Gehirn war KCNJ16 mRNA nachweisbar. In der Niere beschränkte sich die Expression auf die basolaterale Membran von Zellen des distalen Tubulus und des frühen Sammelrohrs. Der Knockout von KCNJ16 wirkte sich besonders stark bei neugeborenen Mäusen aus, deren Nieren noch nicht voll ausgereift sind. Die wenige Tage alten KCNJ16^{-/-} Mäuse zeigten ausgeprägte Störungen in der renalen Elektrolytausscheidung, die sich jedoch nach etwa einer Woche weitgehend normalisierten. In adulten KCNJ16^{-/-} Mäusen war nur noch die PO₄³⁻ Ausscheidung signifikant erhöht. Adulte KCNJ16^{-/-} Mäuse zeigten außerdem eine Hypokaliämie, Hypermagnesiämie und eine metabolische Azidose. Damit unterschied sich der renale Phänotyp dieser Mäuse in einigen wesentlichen Punkten von dem Phänotyp, der von Paulais *et al.* publiziert wurde.

Erst vor kurzem wurde bei einer Patientin mit EAST-ähnlichen Symptomen zum ersten Mal eine Mutation im KCNJ16 Gen entdeckt (R137C). Auch diese Patientin leidet ähnlich wie EAST-Patienten an renalen Salzverlusten und einer Störung des Säure-Basen-Haushaltes. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Auswirkung der Mutation auf das KCNJ10/KCNJ16-Kanalheteromer mit Hilfe der Patch-Clamp Technik an transfizierten Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Membranpotential und der Stromfluss der KCNJ10/R137C-Heteromere gegenüber KCNJ10/KCNJ16 Wildtyp-Heteromeren signifikant verringert waren. Möglicherweise stammten der Reststrom und das Restpotential bei Zellen, die mit KCNJ10/R137C transfiziert waren, von KCNJ10-Homomeren. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die mutierte KCNJ16-Untereinheit einen dominant-negativen Effekt ausübt.

Auch wenn sich die Phänotypen der KCNJ16^{-/-} Mausmodelle untereinander und vom humanem Phänotyp unterscheiden, zeigen die erhobenen Daten eindeutig, dass die KCNJ16-Untereinheit für die Regulation der Rückresorptionsprozesse im DCT von Bedeutung ist. Der genetische Hintergrund spielt vermutlich eine große Rolle bei der genauen Ausprägung des Phänotyps. Für die exakte Aufklärung der Bedeutung von KCNJ16 sind jedoch noch weitere Experimente notwendig.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Eladari, D., Chambrey, R. and Peti-Peterdi, J. (2012) A New Look at Electrolyte Transport in the Distal Tubule. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 325–349.
- [2] Hurwitz, S. (1996) Homeostatic control of plasma calcium concentration. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31, 41–100.
- [3] Hoenderop, J.G., Muller, D., van der Kemp, A.W., Hartog, A., Suzuki, M., Ishibashi, K., Imai, M., Sweep, F., Willems, P.H., van Os, C.H. and Bindels, R.J. (2001) Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol* 12, 1342–1349.
- [4] Kip, S.N. and Strehler, E.E. (2004) Vitamin D3 upregulates plasma membrane Ca^{2+} -ATPase expression and potentiates apico-basal Ca^{2+} flux in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F363-9.
- [5] Mensenkamp, A.R., Hoenderop, J.G.J. and Bindels, R.J.M. (2007) TRPV5, the gateway to Ca^{2+} homeostasis. *Handb Exp Pharmacol*, 207–220.
- [6] Cao, G., Hoenderop, J.G.J. and Bindels, R.J.M. (2008) Insight into the molecular regulation of the epithelial magnesium channel TRPM6. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17, 373–378.
- [7] Glaudemans, B., Knoers, N.V.A.M., Hoenderop, J.G.J. and Bindels, R.J.M. (2010) New molecular players facilitating $\text{Mg}(2+)$ reabsorption in the distal convoluted tubule. *Kidney Int* 77, 17–22.
- [8] Koefoed-Johnsen, V. and Ussing, H.H. (1958) The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol. Scand.* 42, 298–308.
- [9] Tucker, S.J., Imbrici, P., Salvatore, L., D'Adamo, M.C. and Pessia, M. (2000) pH dependence of the inwardly rectifying potassium channel, Kir5.1, and localization in renal tubular epithelia. *J. Biol. Chem.* 275, 16404–16407.
- [10] Lourdel, S., Paulais, M., Cluzeaud, F., Bens, M., Tanemoto, M., Kurachi, Y., Vandewalle, A. and Teulon, J. (2002) An inward rectifier K^{+} channel at the basolateral membrane of the mouse distal convoluted tubule: similarities with Kir4-Kir5.1 heteromeric channels. *Journal of Physiology* 538.2, 391–404.

-
- [11] Wilson, F.H., Kahle, K.T., Sabath, E., Lalioti, M.D., Rapson, A.K., Hoover, R.S., Hebert, S.C., Gamba, G. and Lifton, R.P. (2003) Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 680–684.
- [12] Yang, C.-L., Zhu, X. and Ellison, D.H. (2007) The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex. *J Clin Invest* 117, 3403–3411.
- [13] Yang, C.-L., Zhu, X., Wang, Z., Subramanya, A.R. and Ellison, D.H. (2005) Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransport. *J Clin Invest* 115, 1379–1387.
- [14] Ko, B., Mistry, A.C., Hanson, L., Mallick, R., Cooke, L.L., Hack, B.K., Cunningham, P. and Hoover, R.S. (2012) A new model of the distal convoluted tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 303, F700-10.
- [15] Kleta, R. and Bockenhauer, D. (2006) Bartter syndromes and other salt-losing tubulopathies. *Nephron Physiol* 104, p73-80.
- [16] Speer, C.P. (2009) Pädiatrie. Springer Verlag. Berlin.
- [17] Simon, D.B., Nelson-Williams, C., Bia, M.J., Ellison, D., Karet, F.E., Molina, A.M., Vaara, I., Iwata, F., Cushner, H.M., Koolen, M., Gainza, F.J., Gitleman, H.J. and Lifton, R.P. (1996) Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet* 12, 24–30.
- [18] Wilson, F.H., Disse-Nicodeme, S., Choate, K.A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D.V., Lipkin, G.W., Achard, J.M., Feely, M.P., Dussol, B., Berland, Y., Unwin, R.J., Mayan, H., Simon, D.B., Farfel, Z., Jeunemaitre, X. and Lifton, R.P. (2001) Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293, 1107–1112.
- [19] Kahle, K.T., Wilson, F.H. and Lifton, R.P. (2005) Regulation of diverse ion transport pathways by WNK4 kinase: a novel molecular switch. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 98–103.
- [20] Simon, D.B., Bindra, R.S., Mansfield, T.A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J.M., Sanjad, S.A., Taylor, C.M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G.A., John, E. and Lifton, R.P. (1997) Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* 17, 171–178.

- [21] Krämer, B.K., Bergler, T., Stoelcker, B. and Waldegger, S. (2008) Mechanisms of Disease: the kidney-specific chloride channels CLCKA and CLCKB, the Barttin subunit, and their clinical relevance. *Nat Clin Pract Nephrol* 4, 38–46.
- [22] Konrad, M., Vollmer, M., Lemmink, H.H., van den Heuvel, L.P., Jeck, N., Vargas-Poussou, R., Lakings, A., Ruf, R., Deschenes, G., Antignac, C., Guay-Woodford, L., Knoers, N.V., Seyberth, H.W., Feldmann, D. and Hildebrandt, F. (2000) Mutations in the chloride channel gene CLCNKB as a cause of classic Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol* 11, 1449–1459.
- [23] Peters, M., Jeck, N., Reinalter, S., Leonhardt, A., Tonshoff, B., Klaus G, G.u., Konrad, M. and Seyberth, H.W. (2002) Clinical presentation of genetically defined patients with hypokalemic salt-losing tubulopathies. *Am J Med* 112, 183–190.
- [24] Bockenhauer, D., Feather, S., Stanescu, H.C., Bandulik, S., Zdebik, A.A., Reichold, M., Tobin, J., Lieberer, E., Sterner, C., Landouze, G., Arora, R., Sirimanna, T., Thompson, D., Cross, J.H., van't Hoff, W., Al Masri, O., Tullus, K., Yeung, S., Anikster, Y., Klootwijk, E., Hubank, M., Dillon, M.J., Heitzmann, D., Arcos-Burgos, M., Knepper, M.A., Dobbie, A., Gahl, W.A., Warth, R., Sheridan, E. and Kleta, R. (2009) Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N. Engl. J. Med.* 360, 1960–1970.
- [25] Scholl, U.I., Choi, M., Liu, T., Ramaekers, V.T., Häusler, M.G., Grimmer, J., Tobe, S.W., Farhi, A., Nelson-Williams, C. and Lifton, R.P. (2009) Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5842–5847.
- [26] Bandulik, S., Schmidt, K., Bockenhauer, D., Zdebik, A.A., Humberg, E., Kleta, R., Warth, R. and Reichold, M. (2011) The salt-wasting phenotype of EAST syndrome, a disease with multifaceted symptoms linked to the KCNJ10 K⁺ channel. *Pflugers Arch* 461, 423–435.
- [27] Schlingmann, K.P. and Renigunta A., A minor variant of EAST/SeSAME syndrome is caused by a mutation in KCNJ16 (Kir5.1). (*noch nicht veröffentlicht*)
- [28] Miller, C. (2000) An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* 1(4), reviews0004.1–reviews0004.5.
- [29] Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz Miera, E. de and Rudy, B. (1999) Molecular Diversity of K⁺ Channels. *Ann N Y Acad Sci (Annals New York Academy of Sciences)* 868, 233–285.

- [30] Warth, R. (2003) Potassium channels in epithelial transport. *Pflugers Arch.* 446, 505–513.
- [31] Konstas, A.-A., Korbmacher, C. and Tucker, S.J. (2003) Identification of domains that control the heteromeric assembly of Kir5.1/Kir4.0 potassium channels. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 284, C910-7.
- [32] Jenkinson, D.H. (2006) Potassium channels - multiplicity and challenges. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1, 63–71.
- [33] Hebert, S.C., Desir, G., Giebisch, G. and Wang, W. (2005) Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol. Rev* 85, 319–371.
- [34] Piechotta, P.L., Rapedius, M., Stansfeld, P.J., Bollepalli, M.K., Ehrlich, G., Andres-Enguix, I., Fritzenschaft, H., Decher, N., Sansom, M.S.P., Tucker, S.J. and Baukrowitz, T. (2011) The pore structure and gating mechanism of K2P channels. *EMBO J* 30, 3607–3619.
- [35] Sandoz, G. and Levitz, J. (2013) Optogenetic techniques for the study of native potassium channels. *Front. Mol. Neurosci.* 6, Article 6, 1-9.
- [36] Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69–77.
- [37] Akerstrom, T., Crona, J., Delgado Verdugo, A., Starker, L.F., Cupisti, K., Willenberg, H.S., Knoefel, W.T., Saeger, W., Feller, A., Ip, J., Soon, P., Anlauf, M., Alesina, P.F., Schmid, K.W., Decaussin, M., Levillain, P., Wangberg, B., Peix, J.-L., Robinson, B., Zedenius, J., Backdahl, M., Caramuta, S., Iwen, K.A., Botling, J., Stalberg, P., Kraimps, J.-L., Dralle, H., Hellman, P., Sidhu, S., Westin, G., Lehnert, H., Walz, M.K., Akerstrom, G., Carling, T., Choi, M., Lifton, R.P. and Bjorklund, P. (2012) Comprehensive re-sequencing of adrenal aldosterone producing lesions reveal three somatic mutations near the KCNJ5 potassium channel selectivity filter. *PLoS One* 7, e41926.
- [38] Stowasser, M. (2013) Primary aldosteronism and potassium channel mutations. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 20, 170–179.
- [39] Sandhiya, S. and Dkhar, S.A. (2009) Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *Indian J Med Res* 129, 223–232.
- [40] Wulff, H. and Zhorov, B.S. (2008) K⁺ channel modulators for the treatment of neurological disorders and autoimmune diseases. *Chem. Rev.* 108, 1744–1773.

- [41] Wagner, C.A. (2010) New roles for renal potassium channels. *J Nephrol* 23, 5–8.
- [42] Kubo, Y., Reuveny, E., Slesinger, P.A., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1993) Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* 364, 802–806.
- [43] Kubo, Y., Baldwin, T.J., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362, 127–133.
- [44] Ho, K., Nichols, C.G., Lederer, W.J., Lytton, J., Vassilev, P.M., Kanazirska, M.V. and Hebert, S.C. (1993) Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362, 31–38.
- [45] Bond, C.T., Pessia, M., Xia, X.M., Lagrutta, A., Kavanaugh, M.P. and Adelman, J.P. (1994) Cloning and expression of a family of inward rectifier potassium channels. *Recept. Channels* 2, 183–191.
- [46] Stanfield, P.R. and Sutcliffe, M.J. (2003) Spermine is fit to block inward rectifier (Kir) channels. *J. Gen. Physiol.* 122, 481–484. doi:10.1085/jgp.200308957.
- [47] Sansom, M.S.P., Shrivastava, I.H., Bright, J.N., Tate, J., Capener, C.E. and Biggin, P.C. (2002) Potassium channels: structures, models, simulations. *Biochim. Biophys. Acta* 1565, 294–307.
- [48] Doupnik, C.A., Davidson, N. and Lester, H.A. (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 268–277.
- [49] Reimann, F. and Ashcroft, F.M. (1999) Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol* 11, 503–508.
- [50] Matsuda, H., Saigusa, A. and Irisawa, H. (1987) Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺. *Nature* 325, 156–159.
- [51] Nichols, C.G. and Lopatin, A.N. (1997) Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 171–191.
- [52] Neusch, C., Rozengurt, N., Jacobs, R.E., Lester, H.A. and Kofuji, P. (2001) Kir4.1 Potassium Channel Subunit Is Crucial for Oligodendrocyte Development and In Vivo Myelination. *J. Neurosci. (The Journal of Neuroscience)* 21, 5429–5438.

- [53] Rapedius, M., Paynter, J.J., Fowler, P.W., Shang, L., Sansom, M.S.P., Tucker, S.J. and Baukrowitz, T. (2007) Control of pH and PIP₂ gating in heteromeric Kir4.1/Kir5.1 channels by H-bonding at the Helix-Bundle Crossing. *Landes Bioscience* 1, 327–330.
- [54] S  e, R., MacAulay, N. and Klaerke, D.A. (2009) Modulation of Kir4.1 and Kir4.1-Kir5.1 channels by small changes in cell volume. *Neuroscience Letters* 457, 80–84.
- [55] Bichet, D., Haass, F.A. and Jan, L.Y. (2003) Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat. Rev. Neurosci* 4, 957–967.
- [56] Olsen, M.L. and Sontheimer, H. (2008) Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K⁺ buffering to cell differentiation. *Journal of Neurochemistry* 107, 589–601.
- [57] Lopes, C.M.B., Zhang, H., Rohacs, T., Jin, T., Yang, J. and Logothetis, D.E. (2002) Alterations in conserved Kir channel-PIP₂ interactions underlie channelopathies. *Neuron* 34, 933–944.
- [58] Paynter, J.J., Shang, L., Bollepalli, M.K., Baukrowitz, T. and Tucker, S.J. (2010) Random mutagenesis screening indicates the absence of a separate H⁺ -sensor in the pH-sensitive Kir channels. *channels* 4, 390–396.
- [59] Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I. and Kurachi, Y. (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* 90, 291–366.
- [60] Oliver, D., Baukrowitz, T. and Fakler, B. (2000) Polyamines as gating molecules of inward-rectifier K⁺ channels. *Eur. J. Biochem.* 267, 5824–5829.
- [61] Takumi, T., Ishii, T., Horio, Y., Morishige, K., Takahashi, N., Yamada, M., Yamashita, T., Kiyama, H., Sohmiya, K. and Nakanishi, S. (1995) A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 16339–16346.
- [62] Ito, M., Inanobe, A., Horio, Y., Hibino, H., Isomoto, S., Ito, H., Mori, K., Tonosaki, A., Tomoike, H. and Kurachi, Y. (1996) Immunolocalization of an inwardly rectifying K⁺ channel, K(AB)-2 (Kir4.1), in the basolateral membrane of renal distal tubular epithelia. *FEBS Lett.* 388, 11–15.
- [63] Ishii, M., Horio, Y., Tada, Y., Hibino, H., Inanobe, A., Ito, M., Yamada, M., Gotow, T., Uchiyama, Y. and Kurachi, Y. (1997) Expression and clustered distribution of an

- inwardly rectifying potassium channel, KAB-2/Kir4.1, on mammalian retinal Muller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *J Neurosci* 17, 7725–7735.
- [64] Poopalasundaram, S., Knott, C., Shamotienko, O.G., Foran, P.G., Dolly, J.O., Ghiani, C.A., Gallo, V. and Wilkin, G.P. (2000) Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia* 30, 362–372.
- [65] Marcus, D.C., Wu, T., Wangemann, P. and Kofuji, P. (2002) KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C403–C407.
- [66] Neusch, C., Papadopoulos, N., Müller, M., Maletzki, I., Winter, S.M., Hirrlinger, J., Handschuh, M., Bähr, M., Richter, D.W., Kirchhoff, F. and Hülsmann, S. (2006) Lack of the Kir4.1 Channel Subunit Abolishes K⁺ Buffering Properties of Astrocytes in the Ventral Respiratory Group: Impact on Extracellular K⁺ Regulation. *J Neurophysiol* 3, 1843–1852.
- [67] Djukic, B., Casper, K.B., Philpot, B.D., Chin, L.-S. and McCarthy, K.D. (2007) Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J. Neurosci.* 27, 11354–11365.
- [68] Lachheb, S., Cluzeaud, F., Bens, M., Genete, M., Hibino, H., Lourdel, S., Kurachi, Y., Vandewalle, A., Teulon, J. and Paulais, M. (2008) Kir4.1/Kir5.1 channel forms the major K⁺ channel in the basolateral membrane of mouse renal collecting duct principal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 294, 1398–1407.
- [69] Reichold, M., Zdebik, A.A., Lieberer, E., Rapedius, M., Schmidt, K., Bandulik, S., Sterner, C., Tegtmeier, I., Penton, D., Baukowitz, T., Hulton, S.-A., Witzgall, R., Ben-Zeev, B., Howie, A.J., Kleta, R., Bockenhauer, D. and Warth, R. (2010) KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14490–14495.
- [70] Pessia, M., Tucker, S.J., Lee, K. and Bond, C.T.A.J.P. (1996) Subunit positional effects revealed by novel heteromeric inwardly rectifying K⁺ channels. *The EMBO Journal* 15, 2980–2987.
- [71] Tanemoto, M., Kittaka, N., Inanobe, A. and Kurachi, Y. (2000) In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J. Physiol. (Lond.)* 525 Pt 3, 587–592.

- [72] Yang, Z., Xu, H., Cui, N., Qu, Z., Chanchevalap, S., Shen, W. and Jiang, C. (2000) Biophysical and Molecular Mechanisms Underlying the Modulation of Heteromeric Kir4.1-Kir5.1 Channels by CO₂ and pH. *J. Gen. Physiol.* 116, 33–45.
- [73] Whorton, M.R. and MacKinnon, R. (2011) Crystal structure of the mammalian GIRK2 K⁺ channel and gating regulation by G proteins, PIP₂, and sodium. *Cell* 147, 199–208.
- [74] Lopatin, A.N., Makhina, E.N. and Nichols, C.G. (1994) Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 372, 366–369.
- [75] Tanemoto, M., Abe, T., Onogawa, T. and Ito, S. (2004) PDZ binding motif-dependent localization of K⁺ channel on the basolateral side in distal tubules. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 287, F1148-53.
- [76] Freudenthal, B., Kulaveerasingam, D., Lingappa, L., Shah, M.A., Brueton, L., Wassmer, E., Ognjanovic, M., Dorison, N., Reichold, M., Bockenhauer, D., Kleta, R. and Zdebik, A.A. (2011) KCNJ10 Mutations Disrupt Function in Patients with EAST Syndrome. *Nephron. Physiology* 119, p40-p48.
- [77] Fakler, B., Bond, C.T., Adelman, J.P. and Ruppersberg, J.P. (1996) Heterooligomeric assembly of inward-rectifier K⁺ channels from subunits of different subfamilies: Kir2.1 (IRK1) and Kir4.1 (BIR10). *Pflugers Arch.* 433, 77–83.
- [78] Zou, S.B., Weng, J., Symons, M.N. and Singh, S.M. (2009) Role of Potassium Channel Gene *Kcnj10* in Ethanol Preference in C57bl/6J and DBA/2J Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 33, 394–399.
- [79] Liu, Y., McKenna, E., Figueroa, D.J., Blevins, R., Austin, C.P., Bennett, P.B. and Swanson, R. (2000) The human inward rectifier K⁺ channel subunit Kir5.1 (KCNJ16) maps to chromosome 17q25 and is expressed in kidney and pancreas. *Cytogenet Cell Genet* 90, 60–63.
- [80] Xu, H., Cui, N., Yang, Z., Qu, Z. and Jiang, C. (2000) Modulation of kir4.1 and kir5.1 by hypercapnia and intracellular acidosis. *J. Physiol. (Lond.)* 524 Pt 3, 725–735.
- [81] Hibino, H., Higashi-Shingai, K., Fujita, A., Iwai, K., Ishii, M. and Kurachi, Y. (2004) Expression of an inwardly rectifying K⁺ channel, Kir5.1, in specific types of fibrocytes in the cochlear lateral wall suggests its functional importance in the establishment of endocochlear potential. *Eur. J. Neurosci.* 19, 76–84.

- [82] Ishii, M., Fujita, A., Iwai, K., Kusaka, S., Higashi, K., Inanobe, A., Hibino, H. and Kurachi, Y. (2003) Differential expression and distribution of Kir5.1 and Kir4.1 inwardly rectifying K⁺ channels in retina. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C260-7.
- [83] Salvatore, L., D'Adamo, M.C., Polishchuck, R., Salmons, M. and Pessia, M. (1999) Localization and age-dependent expression of the inward rectifier K⁺ channel subunit Kir 5.1 in a mammalian reproductive system. *FEBS Lett.* 449, 146–152.
- [84] Derst, C., Karschin, C., Wischmeyer, E., Hirsch, J.R., Preisig-Müller, R., Rajan, S., Engel, H., Grzeschik, K.-H., Daut, J. and Karschin, A. (2001) Genetic and functional linkage of Kir5.1 and Kir2.1 channel subunits. *FEBS Lett.* 491, 305–311.
- [85] Chabardès-Garonne, D., Mejean, A., Aude, J.-C., Cheval, L., Di Stefano, A., Gaillard, M.-C., Imbert-Teboul, M., Wittner, M., Balian, C., Anthouard, V., Robert, C., Ségurens, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Doucet, A. and Elalouf, J.-M. (2003) A panoramic view of gene expression in the human kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13710–13715.
- [86] Tanemoto, M., Fujita, A., Higashi, K. and Kurachi, Y. (2002) PSD-95 mediates formation of a functional homomeric Kir5.1 channel in the brain. *Neuron* 34, 387–397.
- [87] Pearson, W.L., Dourado, M., Schreiber, M., Salkoff, L. and Nichols, C.G. (1999) Expression of a functional Kir4 family inward rectifier K⁺ channel from a gene cloned from mouse liver. *J. Physiol. (Lond.)* 514 (Pt 3), 639–653.
- [88] Pessia, M., Imbrici, P., D'Adamo, M.C., Salvatore, L. and Tucker, S.J. (2001) Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1. *J. Physiol. (Lond.)* 532, 359–367.
- [89] Hill, C.E., Briggs, M.M., Liu, J. and Magtanong, L. (2002) Cloning, expression, and localization of a rat hepatocyte inwardly rectifying potassium channel. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G233-40.
- [90] Lagrutta, A.A., Bond, C.T., Xia, X.M., Pessia, M., Tucker, S. and Adelman, J.P. (1996) Inward rectifier potassium channels. Cloning, expression and structure-function studies. *Jpn Heart J* 37, 651–660.
- [91] Lam, H.D., Lemay, A.-M., Briggs, M.M., Yung, M. and Hill, C.E. (2006) Modulation of Kir4.2 rectification properties and pH_i-sensitive run-down by association with Kir5.1. *Biochim Biophys Acta* 1758, 1837–1845.

- [92] Shang, L., Ranson, S.V. and Tucker, S.J. (2009) Kir5.1 underlies long-lived subconductance levels in heteromeric Kir4.1/Kir5.1 channels from *Xenopus tropicalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 501–505.
- [93] Paulais, M., Bloch-Faure, M., Picard, N., Jacques, T., Ramakrishnan, S.K., Keck, M., Sohet, F., Eladari, D., Houillier, P., Lourdel, S., Teulon, J. and Tucker, S.J. (2011) Renal phenotype in mice lacking the Kir5.1 (Kcnj16) K⁺ channel subunit contrasts with that observed in SeSAME/EAST syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10361–10366.
- [94] Trapp, S., Tucker, S.J. and Gourine, A.V. (2011) Respiratory responses to hypercapnia and hypoxia in mice with genetic ablation of Kir5.1 (Kcnj16). *Exp. Physiol.* 96, 451–459.
- [95] Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85–100.
- [96] Yu, S.P. and Kerchner, G.A. (1998) Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J. Neurosci. Res.* 52, 612–617.
- [97] Scholl, U.I., Dave, H.B., Lu, M., Farhi, A., Nelson-Williams, C., Listman, J.A. and Lifton, R.P. (2012) SeSAME/EAST syndrome--phenotypic variability and delayed activity of the distal convoluted tubule. *Pediatr. Nephrol.* 27, 2081–2090.
- [98] Rogers, S.A., Powell-Braxton, L. and Hammerman, M.R. (1999) Insulin-like growth factor I regulates renal development in rodents. *Dev. Genet.* 24, 293–298.
- [99] Qi, Z., Whitt, I., Mehta, A., Jin, J., Zhao, M., Harris, R.C., Fogo, A.B. and Breyer, M.D. (2004) Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F590-6.
- [100] D'Adamo, M.C., Shang, L., Imbrici, P., Brown, S.D.M., Pessia, M. and Tucker, S.J. (2010) Genetic inactivation of KCNJ16 identifies Kir5.1 as an important determinant of neuronal PCO₂/pH sensitivity. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 192-198.
- [101] Doetschman, T. (2009) Influence of Genetic Background on Genetically Engineered Mouse Phenotypes. *Methods Mol Biol* 530, 423–433.

PUBLIKATIONEN

Bandulik S, Schmidt K, Bockenhauer D, Zdebik AA, **Humberg E**, Kleta R, Warth R, Reichold M.01/2011: *The salt-wasting phenotype of EAST syndrome, a disease with multifaceted symptoms linked to the KCNJ10 K(+) channel*. Pflugers Arch 461: 423–435.

Reichold M*, Zdebik AA*, **Lieberer E***, Rapedius M, Schmidt K, Bandulik S, Sterner C, Tegtmeier I, Penton D, Baukrowitz T, Hulton SA, Witzgall R, Ben-Zeev B, Howie AJ, Kleta R, Bockenhauer D, Warth R: *KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:14490–14495. (* Erstautoren)

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, Klootwijk 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. 360: 1960–1970.

Beiträge zu Kongressen und Symposien

Humberg E, Ripper M, Bandulik S, Tegtmeier I, Warth R, Reichold M: *The physiological and pathophysiological relevance of the inwardly rectifying potassium channel KCNJ16 (Kir5.1) in the kidney* (Poster). 4th International Symposium of the Collaborative Kidney Research Centre Sonderforschungsbereich 699, Regensburg 2013

Humberg E, Bandulik S, Tegtmeier I, Ripper M, Reichold M, Warth R: *The effect of the potassium channel subunit Kir5.1 (KCNJ16) on renal electrolyte balance* (Poster). 92. DPG Meeting, Heidelberg 2013

Humberg E: *The physiological and pathophysiological relevance of KCNJ16* (Oral Presentation). RIGeL Summerschool, Regen 2012

Humberg E, Ripper M, Schmidt K, Bandulik S, Tegtmeier I, Witzgall R, Meese C, Schmidt H, Warth R, Reichold M: *The physiological and pathophysiological relevance of the inwardly rectifying potassium channel Kir5.1 (KCNJ16) in the kidney* (Poster). 91. DPG Meeting, Dresden 2012

Humberg E, Ripper M, Schmidt K, Bandulik S, Tegtmeier I, Witzgall R, Meese C, Schmidt H, Warth R, Reichold M: *The physiological and pathophysiological relevance of the inwardly rectifying potassium channel Kir5.1 (KCNJ16) in the kidney* (Poster). RIGeL Summerschool, Regen 2011

Humberg E, Schmidt K, Zdebik A, Rapedius M, Warth R, Bandulik S, Sterner C, Tegtmeier I, Penton D, Baukrowitz T, Hulton SA, Witzgall R, Ben-Zeev B, Howie A, Kleta R, Bockenhauer D, Reichold M: *KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome decrease channel function* (Poster). 90. DPG Meeting, Regensburg 2011

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Nephrons.....	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung von Zellen des frühen und späten DCT	3
Abbildung 3: Lokalisation der bisher bekannten EAST-Mutationen von hKCNJ10.....	8
Abbildung 4: Membrantopologie der drei großen Kaliumkanalfamilien.....	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Membrantopologie eines Kir-Kanals	12
Abbildung 6: Phylogenetischer Baum der Kir-Kanalfamilie	13
Abbildung 7: Lokalisation bekannter Motive mit wichtigen Funktionen für KCNJ10	16
Abbildung 8: Lokalisation der einzigen bisher bekannten hKCNJ16-Mutation	19
Abbildung 9: Schematischer Ablauf der GFR Experimente	46
Abbildung 10: Die vier verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen	47
Abbildung 11: Vereinfachtes Schaltbild der Whole cell Ableitung	49
Abbildung 12: Expression von KCNJ16 in verschiedenen Geweben von Wildtypmäusen.....	52
Abbildung 13: Übersichtsaufnahme der Niere einer KCNJ16 ^{+/+} Maus.....	53
Abbildung 14: Übersichtsaufnahme der Niere einer KCNJ16 ^{-/-} Maus.....	54
Abbildung 15: Detailaufnahmen der Nierentubuli von KCNJ16 ^{+/+} Mäusen.....	55
Abbildung 16: Wachstumskurven von KCNJ16 ^{+/+} und KCNJ16 ^{-/-} Mäusen.....	56
Abbildung 17: Elektrolytkonzentrationen im Plasma von KCNJ16 ^{+/+} und KCNJ16 ^{-/-} Mäusen (Ionenchromatographie)	58
Abbildung 18: Elektrolytkonzentrationen im Plasma von KCNJ16 ^{+/+} und KCNJ16 ^{-/-} Mäusen (AVL-Gerät bzw. Blutgasanalysator)	59
Abbildung 19: Renale Elektrolytausscheidung vier Tage alter KCNJ16 ^{+/+} und KCNJ16 ^{-/-} Mäuse	61
Abbildung 20: Altersabhängige Ausscheidung verschiedener Elektrolyte von KCNJ16 ^{+/+} und KCNJ16 ^{-/-} Mäusen über den Urin.....	64
Abbildung 21: Renale Elektrolytausscheidung adulter KCNJ16 ^{+/+} und KCNJ16 ^{-/-} Mäuse (Ionenchromatograph)	65
Abbildung 22: Renale Elektrolytausscheidung vor und nach der Applikation von Diuretika	67
Abbildung 23: Urinfluss und renale Kreatininkonzentration von KCNJ16 ^{+/+} und KCNJ16 ^{-/-} Mäusen	68

Abbildung 24: pH-, HCO ₃ ⁻ - und Blutgaswerte adulter KCNJ16 ^{+/+} und KCNJ16 ^{-/-} Mäuse.....	69
Abbildung 25: Aldosteronwerte im Plasma von KCNJ16 ^{+/+} und KCNJ16 ^{-/-} Mäusen	71
Abbildung 26: Verlauf der Blutdruckmessungen	72
Abbildung 27: Systolischer Blutdruck von KCNJ16 ^{+/+} und KCNJ16 ^{-/-} Mäusen	72
Abbildung 28: Glomeruläre Filtrationsrate von KCNJ16 ^{+/+} und KCNJ16 ^{-/-} Mäusen	73
Abbildung 29: Membranpotential (schein)transfizierter CHO-Zellen unter Ringer und Ba ²⁺	75
Abbildung 30: Ba ²⁺ -sensitiver Strom von (schein)transfizierten CHO-Zellen	76
Abbildung 31: Typical Traces von KCNJ10/KCNJ16 Heteromeren	77
Abbildung 32: pH-Abhängigkeit des KCNJ10/KCNJ16 Kanalheteromers	78
Abbildung 33: Typical Traces von KCNJ10/R137C-Heteromeren.....	79
Abbildung 34: pH-Abhängigkeit von KCNJ10/KCNJ16- und KCNJ10/R137C-Heteromeren	80
Abbildung 35: Immunfluoreszenzfärbung von transfizierten CHO-Zellen.....	82

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AQP2	Aquaporin 2
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CC	Current clamp
CCD	Cortical collecting duct = kortikales Sammelrohr
CD	Collecting duct = Sammelrohr
CHO-Zellen	Ovarzellen des chinesischen Hamsters (chinese hamster ovary cells)
cDNA	Komplementäre DNA
DCT	Distal convoluted tubule = distales Konvolut
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
E _K	Kaliumgleichgewichtspotential
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HCTZ	Hydrochlorithiazid
HEK-Zellen	Human Embryonic Kidney 293 Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGNC	Human Genome Nomenclature Committee
I. E.	Internationale Einheit
IUPHAR	International Union of Pharmacology
KG	Körpergewicht
K _{ir}	Inwardly rectifying K ⁺ channels
K _V -Kanäle	Spannungsabhängige Kaliumkanäle
MCD	Medullary collecting duct = medulläres Sammelrohr
min	Minute

N	nano
NCC	Natrium-Chlorid-Kotransporter; auch NCCT
P	pico
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
P-Domäne	Porenbildende Domäne
PEN	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PHA II	Pseudohypoaldosteronismus Typ II
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
p.p.	post partum
PTH	Parathormon
R _M	Membranwiderstand
ROMK	Renal outer medullary K ⁺ channel
R _S	serieller Widerstand
SEM	Standard error of the mean
sog.	sogenannte
STREP	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TM	Transmembrandomäne
U/min	Umdrehungen pro Minute
VC	Voltage clamp
V _m	Membranpotential (membrane voltage)

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

- (1) Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.
- (2) Die im Methodenteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.
- (3) Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
- (4) Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Evelyn Humberg

DANKSAGUNG

Zu guter Letzt möchte ich mich hier noch bei allen Personen herzlich bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit mit Worten und Taten unterstützt haben:

An allererster Stelle gilt mein besonderer Dank natürlich Herrn Prof. Dr. Richard Warth für die Überlassung des Themas, die umfassende wissenschaftliche Betreuung sowie die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung der Arbeit. Er hat mich jederzeit mit kompetenten Ratschlägen und aufmunternden Worten unterstützt und es war mir daher stets eine Freude, für ihn zu arbeiten.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Markus Reichold für die Mitbetreuung und die Korrektur meiner Arbeit bedanken. Auch Herrn Dr. Sascha Bandulik möchte ich für zahlreiche Ratschläge und Denkanstöße und seine Hilfe bei der Auswertung der ionenchromatographischen Messungen bedanken.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Konrad (Universität Münster) und Prof. Waldegger (Philipps Universität Marburg) möchte ich für die Zusammenarbeit und insbesondere für die Bereitstellung der KCNJ16-Plasmide danken. Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer Schreiber aus der AG Prof. Dr. Kunzelmann für viele hilfreiche Tipps zur erfolgreichen site-directed Mutagenesis.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an meine beiden Kolleginnen Ines Tegtmeier und Christina Sterner, unsere beiden guten Seelen im Labor, die mich immer super unterstützt haben und mir eine Vielzahl von Methoden beigebracht haben. Ein extra Dank geht dabei noch an Ines, weil sie so fleißig meine Proben durch den Ionenchromatographen gejagt hat. Philipp Tauber möchte ich für die Aldosteronmessungen und für viele erheiternde Gespräche, die den Laboralltag aufgelockert haben, danken.

Ein ganz spezieller Dank gilt auch meiner Praktikantin und Bachelor-Studentin Franziska Scherl, die mich in der heißen Endphase der Doktorarbeit bei den Patch-Clamp Experimenten und Immunfluoreszenzfärbungen äußerst tatkräftig unterstützt hat und dadurch auch zum erfolgreichen Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Auch an meine übrigen (ehemaligen) Kollegen Carsten, Julia, Maria und David und die Kollegen aus den Arbeitsgruppen der gesamten Physiologie ein herzliches Dankeschön für die tolle Arbeitsatmosphäre am Institut und viele lustige und nette Gespräche, die mich an frustrierenden Labortagen stets aufmunterten.

Meinen Eltern Maria und Johann Lieberer möchte ich besonders herzlich dafür danken, dass sie mich mein Leben lang finanziell sowie seelisch und moralisch unterstützt haben und mir dadurch erst mein Studium und die anschließende Promotion ermöglicht haben. Auch meiner Schwester Nicole danke ich für viele nützliche Tipps und aufmunternde Worte.

Und last but not least geht ein riesengroßes Dankeschön an meinen Ehemann Martin, der mich nun seit über 14 Jahren durch alle Höhen und Tiefen begleitet und die größte Stütze in meinem Leben ist. Lieber Martin, Du hast mir die Kraft gegeben, die letzten Jahre gut zu überstehen, auch wenn das für Dich sicher auch nicht immer leicht war! DANKE ♥