

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität
Tübingen
Abteilung Molekularpharmakologie
Abteilungsleiter: Professor Dr. U. Quast**

**Molekulare Charakterisierung von einwärtsgerichtenden
Kaliumkanälen (Kir) in reninsezernierenden Zellen in der
afferenten Arteriole der Rattenniere**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

**Anke Leichtle
aus
Ehingen**

2005

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. U. Quast
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. S. Huber

meiner Familie gewidmet

I. Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Verwendete Abkürzungen	VII
1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	1
1.1	Membranpotential.....	2
1.2	Kaliumkanäle.....	4
1.2.1	Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv).....	5
1.2.2	Zwei-Poren-Domänen-Kaliumkanäle (TWIK).....	7
1.2.3	Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (Kir).....	8
1.3	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	20
1.4	Aufbau der Niere.....	22
1.5	Der juxtaglomeruläre Apparat: Lokalisation und Synthese von Renin.....	25
1.6	Regulation der Reninsekretion.....	26
1.7	Das Membranpotential in reninsezernierenden Zellen.....	27
1.8	Fragestellung.....	31
2	MATERIAL UND VERSUCHSTIERE.....	32
2.1	Chemikalien, Enzyme, Kits.....	32
2.2	Puffer und Lösungen.....	35
2.3	Geräte und Hilfsmittel.....	38
2.4	Antikörper.....	40
2.5	Primersequenzen und Primerdesign 5' → 3'.....	41
2.6	Versuchstiere.....	42
3	METHODEN.....	43
3.1	Proteinnachweise.....	43
3.1.1	Immunfluoreszenzfärbungen.....	43
3.1.2	Western Blot.....	55
3.2	RNA-Nachweis.....	73

3.2.1	RT-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion nach cDNA Synthese durch reverse Transkription)	73
4	ERGEBNISSE	88
4.1	Protein- und Immunhistochemische Ergebnisse auf Proteinebene	88
4.1.1	Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen.....	88
4.1.2	Ergebnisse des Western Blots	110
4.2	Molekularbiologische Nachweise auf RNA-Ebene.....	114
4.2.1	Ergebnisse der RT-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion nach cDNA-Synthese durch reverse Transkription)	114
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	125
5	DISKUSSION	127
5.1	Diskussion der Methoden	128
5.1.1	Immunhistochemischer Nachweis.....	128
5.1.2	Western Blot	131
5.1.3	RT-PCR	132
5.2	Diskussion der Ergebnisse der Kir-Subtypen	135
5.2.1	Kir6.1	135
5.2.2	Die klassischen einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle (Kir2.x)..	142
6	ZUSAMMENFASSUNG	155
7	LITERATURVERZEICHNIS	157

II. Verwendete Abkürzungen

aA	afferente Arteriole
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
A. bidest	bidestilliertes Wasser
ACE	Angiotensin-I-Konversionsenzymhemmer
AK	Antikörper
AK 1	Primärantikörper
AK 2	Sekundärantikörper
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumin“, Rinderserumalbumin
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumionenkonzentration
[Ca ²⁺] _o	extrazelluläre Kalziumionenkonzentration
cDNA	„complementary DNA“, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CCCP	Karbonylzyanid-3-chlorphenylhydrazon
CRAC	„Calcium release-activated calcium channel“, Kalziumkanal, der durch die Entleerung intrazellulärer Speicher aktiviert wird
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser mit Millipore gereinigt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DiBAC ₄ (3)	bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure)Trimethinoxonol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA bzw. DNS	„desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
eA	efferente Arteriole
E	Extinktion
EC ₅₀	halbmaximale Wirkkonzentration (Aktivierung) eines Stoffes
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-Tetraessigsäure
EGM	extraglomeruläres Mesangium
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
g	Fallbeschleunigung
GAR	„goat anti rabbit“, Ziege gegen Kaninchen
GITC	Guanidiniumisothiocyanat
GL	Glomerulum
GST	„glutathione s-transferase“
h	Stunde
HEK-293	„human embryonic kidney cells“-293
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HEPES-PS	HEPES gepufferte physiologische Salzlösung
HPLC	„high pressure liquid chromatography“, Hochdruck- flüssigkeitschromatographie
i.d.	„inner diameter“, Innendurchmesser
i.p.	intra peritoneal
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IgG	Immunglobuline der Klasse G (Gammaglobuline)
JGZ	juxtaglomeruläre Zellen
[K ⁺] _o	extrazelluläre Kaliumionenkonzentration
K _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver K ⁺ -Kanal
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
K _{ir}	„inwardly rectifying K ⁺ channel“, einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal
MD	Macula densa
min	Minute

MOPS	3-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	„messenger ribonucleid acid“, Boten-Ribonukleinsäure
MWS	Molekulargewichtsstandard
NDS	„normal donkey serum“, Esel-Normalserum
NGS	„normal goat serum“, Ziegen-Normalserum
NKS	Kaninchen-Normalserum
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
o.d.	„outer diameter“, Aussendurchmesser
OD	optische Dichte
ODI	„optical density integrated“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PE	Polyethylen
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIPA	„radio-immunoprecipitation assay“
RNA bzw. RNS	„ribonucleid acid“, Ribonukleinsäure
RSB	„resuspending electrophoresis sample buffer“
RT	reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	„standard error of the mean“, mittlerer Fehler des Mittelwertes
SL	Stammlösung
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TALH	„thick ascending limb“, dicker aufsteigender Ast der Henle Schleife
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBS	„tris buffered saline“
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminomethan
TS	„tris saline“
UV	ultraviolett
v/v	„volume per volume“
vWF	von Willebrand Faktor
w/v	„weight per volume“
x	mal
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Die Hypertonie, der chronisch zu hohe Blutdruck, gilt als zentraler Risikofaktor für Herzinfarkt und Schlaganfall. Diese beiden Erkrankungen stellen die Haupttodesursache in den westlichen Industrieländern dar und führen in der Mortalitätsstatistik deutlich vor der Gesamtheit aller Krebserkrankungen (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2002).

Die große Bedeutung der Hypertonie für das öffentliche Gesundheitswesen liegt in ihrer weiten Verbreitung als „Volkskrankheit“ und in einer hohen Dunkelziffer. In den westlichen Industrieländern steigt die Prävalenz der Hypertonie mit zunehmendem Alter von 10% bis > 50%. Um den Risikofaktor Bluthochdruck effektiv zu reduzieren, ist eine rechtzeitige und meist dauerhafte Behandlung erforderlich. In der aktuellen antihypertensiven Therapie kommen standardmäßig ACE-Hemmer (Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzyms) und AT₁-Blocker (Antagonisten des ANG II AT₁-Rezeptors) zum Einsatz. Beide Medikamente wirken als Hemmstoffe des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und weisen auf die Bedeutung des RAAS als eines der wichtigsten Regulatoren des Blutdrucks, des Extrazellulärvolumens sowie des Wasser- und Elektrolytgleichgewichts des Organismus hin.

Den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im System des RAAS stellt dabei die Reninsekretion aus der Niere dar. Renin wird in den reninsezernierenden juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet und gespeichert. Seine Sekretion auf zellulärer Ebene unterliegt einer komplexen Regulation, wobei v.a. dem Membranpotential der Zellen und seiner Aufrechterhaltung durch Kaliumkanäle eine besondere Bedeutung zukommt.

Im folgenden soll die komplexe Regulation und Modulation der Reninsekretion und die dafür bedeutende Rolle des Membranpotentials sowie der Kaliumkanäle erläutert werden.

1.1 Membranpotential

Die Zellmembran jeder Zelle besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht. In der Lipiddoppelschicht befinden sich Proteinstrukturen als bewegliche Transportmoleküle wie Ionenpumpen oder als Poren in Form von Ionenkanälen. Die Ionenkanäle können geöffnet oder geschlossen vorliegen und im Offenzustand anorganische Ionen wie K^+ , Ca^{2+} , Na^+ und Cl^- mittels Diffusion durch die Zellmembran fließen lassen.

Wenn eine Membran unterschiedlich zusammengesetzte Elektrolytlösungen voneinander trennt und sie für die Ionen der Elektrolyte unterschiedliche Durchlässigkeiten besitzt, entsteht ein durch Diffusion aufgebautes Potentialgradient (Diffusionspotential). Dieses Diffusionsruhepotential wird als Membranpotential einer Zelle bezeichnet.

Erregbare Membranen *in vivo* sind im Ruhezustand für Na^+ -Ionen wenig, für K^+ -Ionen relativ gut permeabel. Dadurch kann sich ein Diffusionspotential ausbilden, das hauptsächlich von K^+ getragen wird. In erster Näherung darf das Ruhemembranpotential somit als K^+ -Gleichgewichtspotential interpretiert werden. Die K^+ -Ionen wandern entlang ihres Konzentrationsgradienten von intrazellulär (40-fach höhere Konzentration) nach extrazellulär, wobei die Membranaußenseite positiv und die Innenseite negativ wird.

Dieser durch Diffusion aufgebaute Potentialgradient drängt die K^+ -Ionen entlang ihres elektrischen Gradienten wieder nach intrazellulär. Das Potential, bei dem der Konzentrationsgradient mit dem elektrischen Gradienten im Gleichgewicht steht wird als K^+ -Gleichgewichtspotential bezeichnet.

Das K^+ -Gleichgewichtspotential sowie das Gleichgewichtspotential anderer Ionen, lässt sich mit der Nernst-Gleichung berechnen:

$$E \text{ (mV)} = R \times T / (z \times F) \times \ln (C_a / C_i)$$

E = Spannung des Membranpotentials

R = allgemeine Gaskonstante = $8,3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = absolute Temperatur in Kelvin = $308 = 35 \text{ }^\circ\text{C}$

z = Wertigkeit des Ions

F = Faraday-Konstante = $9,6485 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$

C_a = Ionenkonzentration auf der Außenseite der Membran (extrazellulär)

C_i = Ionenkonzentration auf der Innenseite der Membran (intrazellulär)

Bei einem einwertigen, positiven Kation und unter der Annahme von einer Körpertemperatur von 37 ° lässt sich die Formel vereinfachen:

$$E(\text{mV}) = 61 \text{ mV} \times \log (C_a / C_i)$$

Bei intrazellulären Messungen im Vergleich mit einer extrazellulären Referenzelektrode lässt sich bei typisch erregbaren Zellen ein Ruhemembranpotential von $\sim 90 \text{ mV}$ bestimmen, was dem Nernst-Gleichgewichtspotential für K^+ angenähert ist.

Die große Vielzahl von selektiven Ionenkanälen für K^+ , die häufig auch in hoher Dichte in der Zellmembran vorliegen, deutet auf eine elementare Rolle des K^+ -Ions und der selektiven Kaliumkanäle für das Aufrechterhalten des Ruhemembranpotentials und der Erregbarkeit der Zelle hin.

1.2 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind porenbildende Proteine in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran, die selektiv K^+ -Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten leiten. Sie sind sowohl in Zellen von erregbaren als auch von unerregbaren Geweben exprimiert und dort unter anderem für die basale Leitfähigkeit der Membran verantwortlich.

Das Schließen von K^+ -Kanälen führt zu einer Depolarisation der Zellen. Dadurch werden in erregbaren Zellen spannungsabhängige Na^+ - oder Ca^{2+} -Kanäle der Zellen aktiviert (Schrittmacherzellen in Herz und Gehirn, β -Zelle des Pankreas).

Die Öffnung von Kaliumkanälen bewirkt eine Hyperpolarisation des Membranpotentials in Richtung des Kalium-Gleichgewichtspotentials von ~ 90 mV. Das Membranpotential der Zelle entfernt sich von der Aktivierungsschwelle der spannungsabhängigen Ionenkanäle, wodurch die Zelle weniger erregbar wird.

Die molekulare Vielfalt von K^+ -selektiven Ionenkanälen übertrifft die der anderen Gruppen von Ionenkanälen bei weitem. Eine der größten Errungenschaften bei der Erforschung dieser molekularen Vielfalt der K^+ -Kanäle war die Darstellung der ersten dreidimensionalen Struktur einer Pore eines K^+ -Kanals (KcsA), im Bakterium *Streptomyces lividans* (Doyle et al., 1998).

Die bislang bekannten Kaliumkanäle lassen sich entsprechend der elektrophysiologischen Eigenschaften und der angenommenen Membrantopologie ihrer porenbildenden Untereinheiten in drei Klassen einteilen: spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv), Zwei-Poren-Domänen-Kaliumkanäle (TWIK), und einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (Kir).

1.2.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle (Kv)

Die erste Klasse, mit den momentan meisten bekannten Vertretern, bilden die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle. Entdeckt wurden sie im Riesenaxon des Tintenfisches *Loligo* (Hodgkin et al., 1952). Die Entdeckung des Riesenaxons 1936 war bahnbrechend für die Aufklärung der Erregungsphysiologie und eine Voraussetzung für die ab 1949 von Hodgkin und Huxley verwendete Voltage-clamp Technik (Spannungsklemme), die es erstmals ermöglichte Ionenströme und nicht nur den Verlauf des Membranpotentials präzise zu messen.

Die molekulare Kenntnis der spannungsabhängigen Kaliumkanäle leitet sich von den ursprünglich klonierten Subfamilien der *Drosophila* K^+ -Kanäle Shaker, Shab, Shal und Shaw ab (Salkoff et al., 1992). Dies sind Bezeichnungen für Gene bestimmter Verhaltensmutanten. Die erste K^+ -Kanaluntereinheit, die geklont wurde, war der *Drosophila* K^+ -Kanal Shaker. Shaker wurde 1987 von der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* geklont (Kamb et al., 1987; Tempel et al., 1987). Analog zur Homologie der Kaliumkanaluntereinheit wurden drei weitere verwandte Kanäle von *Drosophila* identifiziert und nach ihren Genen Shab, Shal und Shaw benannt (Butler et al., 1989). Die ihrer Homologie entsprechend identifizierten K^+ -Kanäle (Kv1.x-Kv12.x) werden in die Untergruppe der spannungsabhängigen Kaliumkanäle (Kv) zusammengefaßt.

Innerhalb der Kv-Kanäle nehmen die Calcium-aktivierten K^+ -Kanäle (BK_{Ca} (big): $K_{Ca}1.1$, $K_{Ca}4.x$, $K_{Ca}5.1$, IK_{Ca} (intermediate): $K_{Ca}3.1$, SK_{Ca} (small): $K_{Ca}2.x$), die mit dem „Long QT-Syndrom“ assoziierten K_{ATP} -Kanäle ($KCNQ_x/Kv7.x$) und die HERG-Kanäle (human ether-a-gogo related gene $Kv10.x-Kv12.x$) auch aufgrund ihrer klinischen Relevanz eine Sonderstellung ein (Gutman und Chandy, 1993). So könnte bei Patienten mit Sichelzellanämie durch Schließen der Calcium-aktivierten IK^+ -Kanäle in Erythrozyten mit Clotrimazol eine Sichelzellbildung verhindert werden (Brugnara et al., 1996). BK wird in rein sezernierenden Zellen nachgewiesen (Friis et al., 2003). $KCNQ_x$ spielen in der Kontrolle der neuronalen Erregung eine wichtige Rolle. Eine Mutation von $KCNQ_1$ wurde in Verbindung mit dem „Long-QT-Syndrom“ sowie epileptischen

Syndromen beschrieben (Cooper und Jan, 1999). Das „Long-QT-Syndrom“ ist eine Anomalie des Elektrokardiogramms (EKG) in Form einer pathologisch verlängerten QT-Zeit, das sich klinisch durch Anfälle von Synkopen oder Herzstillstand manifestiert. Ursache der Anfälle sind ventrikuläre Tachyarrhythmien, sogenannte „torsade de pointes“, die z.B. durch Streß oder bestimmte Pharmaka, wie Antiarrhythmika, Antihistaminika oder Antibiotika ausgelöst werden können. Aber auch Erbkrankheiten können zum „Long-QT-Syndrom“ führen. Der durch Homologie zum *Drosophila eag*-Gen (*eag*=Verhaltensmutante) klonierte HERG-Kanal ist aufgrund seiner lebensgefährlichen arrhythmogenen Wirkung durch Interaktionen mit Medikamenten, wie z.B. Clarithromycin oder Terfenadin von Bedeutung. Heute werden deshalb neue Medikamente auf eine mögliche Interaktion mit dem HERG-Kanal getestet (Süßbrich et al., 1996; Russ, persönliche Mitteilung).

Die α - (=porenbildenden) Untereinheiten eines Kv-Kanals bestehen aus sechs helikalen Transmembransegmenten (S1-S6, 6TM) und einer Schleife (P-Loop oder H5) zwischen S5 und S6.

Die P-Loop ist direkt an der Porenbildung beteiligt und beinhaltet das für die Ionen-selektivität aller K^+ -Kanäle essentielle Aminosäuresequenzmotiv GYG (oder GFG) (Abb. 1.1). Das S4-Segment enthält in regelmäßiger Anordnung positiv geladene Aminosäuren und erfüllt in

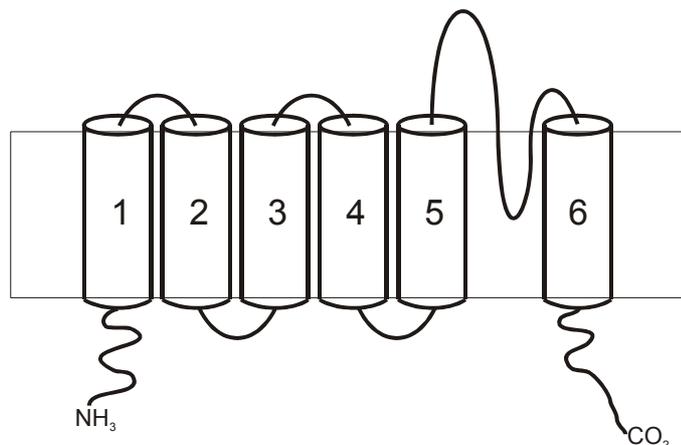


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Transmembrantopologie einer Untereinheit eines Kv-Kanals.

Analogie zu einem vergleichbaren Strukturelement der spannungsabhängigen Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle die Funktion eines Spannungssensors (Catterall, 1992). Sowohl der Amino (N-), als auch der Carboxyl (C-) Terminus sind intrazellulär lokalisiert (Isomoto et al., 1997). Auf diesen Termini sind bei verschiedenen Vertretern unterschiedliche Funktionen lokalisiert, unter anderem die spannungsabhängige Inaktivierung, die Regulation durch Phosphorylierung

oder die Fähigkeit mit anderen Untereinheiten zu assoziieren. Ein funktioneller Kv-Kanal liegt als Tetramer vor, d.h. er wird aus jeweils vier homo- oder heteromeren Kv-Untereinheiten gebildet. Funktionell ist allen Vertretern der spannungsabhängigen K^+ -Kanäle gemeinsam, daß sie, ausgehend vom Ruhemembranpotential, durch Depolarisierung aktiviert werden (Brandts und Pott, 2000).

1.2.2 Zwei-Poren-Domänen-Kaliumkanäle (TWIK)

Eine neue, im Hinblick auf ihre Funktion eher unbekanntere Klasse wird von den sogenannten Zwei-Poren-Domänen-Kanälen gebildet. Ihr erster Vertreter TOK1 wurde in *Saccharomyces cerevisiae*, einem Hefepilz, identifiziert (Kamb et al., 1987; Tempel et al., 1987). Weitere Vertreter konnten v.a. in Neuronen und in Herzmuskelzellen (Brandts und

Pott, 2000) identifiziert werden. Die Kanäle werden als TWIK (two pore domain weakly inward-rectifying K channel) oder TBAK (two pore background K^+ -channel) bezeichnet, mit einer angenommenen 4TM-2P Topologie (Abb. 1.2). Über die Funktion dieser Kanäle ist bislang wenig bekannt. Es wird vermutet, daß sie in Neuronen das Ruhe-

membranpotential unter Ruhebedingungen nahe des Kaliumgleichgewichtspotentials stabilisieren (Yi und Jan, 2000). Bei starker Aktivierung dieser Zwei-Poren-Domänen-Kaliumkanäle wird angenommen, daß durch Hyperpolarisation von Neuronen eine Blockade des Aktionspotentials mit nachfolgender schnell anflutender Anästhesie bewirkt wird (Goldstein et al., 2002). Somit sind diese Kanäle v.a. für die Forschung in der Anästhesie von Bedeutung.

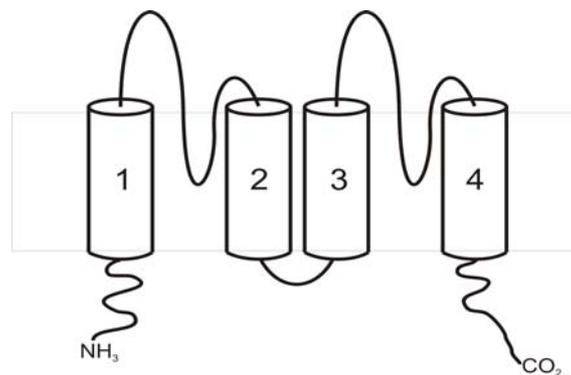


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Transmembrantopologie einer Untereinheit eines 2-Poren Kaliumkanals (TWIK).

1.2.3 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (Kir)

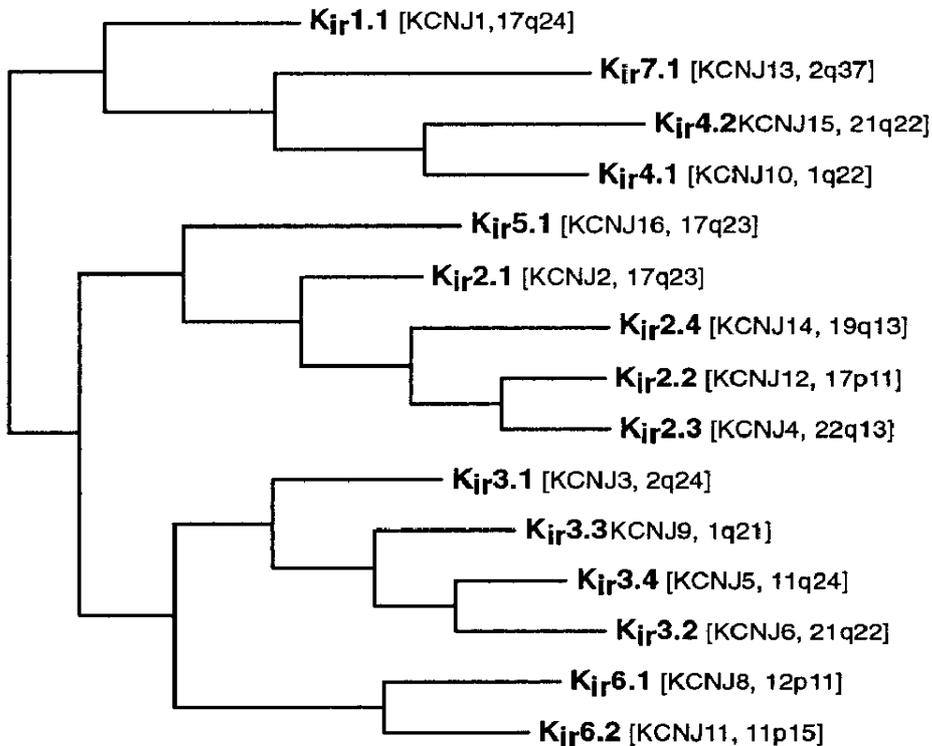


Abb. 1.3: Phylogenetischer Stammbaum der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle (Gutman und Chandy, 1993).

Einwärtsgleichrichtende Kanalproteine bilden entsprechend der Homologie ihrer Aminosäuresequenzen eine Klasse, die in sieben Untergruppen unterteilt ist und als Kirx.y. (K inward rectifier) bezeichnet werden (Doupnik et al., 1995; Nichols und Lopatin, 1997; Abb. 1.3).

Die Klasse der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle ist funktionell dadurch charakterisiert, daß sie Einwärtsströme (d.h. bei Potentialen negativ zum Nernst-Potential für K^+) wesentlich besser passieren lassen als Auswärtsströme. K^+ -Ionen fließen entsprechend von extrazellulär nach intrazellulär. Die erste elektrophysiologische Identifizierung des klassischen einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanals erfolgte in der Membran des Skelettmuskels (Katz,

1949), wo sie als „unnormale Gleichrichter“ (anormalous rectifier) bezeichnet wurden.

Auch aufgrund der elektrophysiologischen Charakteristik spielen die Kir-Kanäle eine elementare Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, der Regulation der Aktionspotentialdauer und der Modulation der elektrischen Aktivität einer Vielzahl von Zellen sowie bei der Insulin- und Reninsekretion und beim epithelialen K^+ -Transport (Isomoto et al., 1997; Reimann und Ashcroft, 1999; Russ et al., 2003a). Entschlüsselt werden konnte die molekulare Struktur des Kir-Kanals erstmals 1993. Ein „ATP-abhängiger Kir-Kanal“, ROMK1/KIR1.1 wurde vom äußeren Mark der Rattenniere (Ho et al., 1993) und ein als „klassischer“ Kir-Kanal bezeichneter IRK1/Kir2.1 (Kubo et al., 1993) wurde aus einer Makrophagenzelllinie der Maus geklont. Strukturell sind die Kir-Kanäle eine Teilstruktur der Kv-Kanäle. Die α -Untereinheit der Kir-Kanäle entspricht

schematisch dem S5-P-S6 Segment der spannungsabhängigen Kanäle, d.h. die Porenregion entspricht einer 2TM-1P Topologie (Abb. 1.4). Die beiden Transmembransegmente M1 und M2 werden durch die extraplasmatische Linkerregion (P-Loop oder H5) verbunden, die mit ihrer spezifischen Aminosäuresequenz GYG (Gly-Tyr-Gly) oder GFG (Gly-Phe-Gly) für die Ionenselektivität und die Leitfähigkeit der Kir-Kanäle entscheidend ist (Doupnik et al., 1995; Nichols und Lopatin, 1997).

Entsprechend den Kv-Kanälen werden die funktionellen Kir-Kanäle durch Assoziation zu Tetrameren gebildet, die sich aus vier homo- oder heteromeren Untereinheiten einer Familie zusammensetzen.

Die Fähigkeit der Kanaluntereinheiten funktionelle homomere oder heteromere Tetramerkomplexe zu bilden, ist für die große Vielfalt an Kir-Kanälen verantwortlich (Pessia et al., 1996). Inwieweit die Kir-Varianten Hetero- oder Homotetramere bilden, ist jedoch nicht abschließend geklärt. Für Kir3.x Kanäle

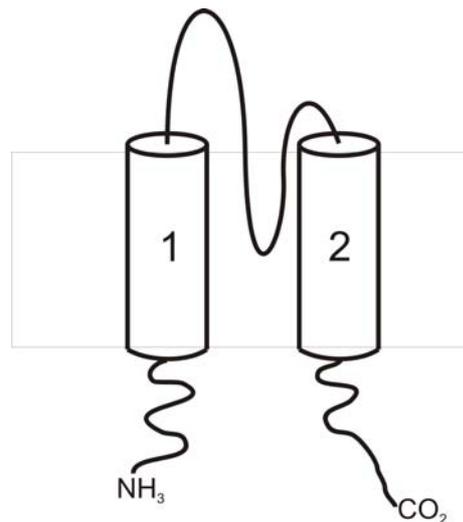


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Transmembrantopologie einer Kir-Untereinheit.

wird jedoch das Vorkommen als Heteromer in Gehirn und Herzen beschrieben (Reimann und Ashcroft, 1999). Neuere Untersuchungen weisen auf mögliche Heteromerbildung von Kir2.x *in vivo* hin (Derst et al., 2001; Schram et al., 2002; Preisig-Müller et al., 2002; Zobel et al., 2003).

Der Kir6.x-Kanal bildet insofern eine Ausnahme, als daß seine vier α -porenformenden Untereinheiten mit jeweils einer regulatorischen β -Untereinheit, einem Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SUR), assoziieren und als oktamere Kanalkomplex vorliegt (Abb. 1.5; Clement IV et al., 1997; Ashcroft und Gribble, 1998; Reimann und Ashcroft, 1999). Die Bezeichnung Sulfonylharnstoff-Rezeptor resultiert aus der Fähigkeit der Sulfonylharnstoffderivate, durch die Bindung an das Protein diese speziellen Kanäle zu blockieren. Sulfonylharnstoffderivate, mit ihrem bekanntesten Vertreter Glibenclamid, werden in der Therapie des Typ II-Diabetes eingesetzt.

Chronologisch sind Kir2.x-Kanäle die ersten identifizierten Kir-Kanäle, die sich durch ihre starke gleichrichtende Eigenschaft auszeichnen.

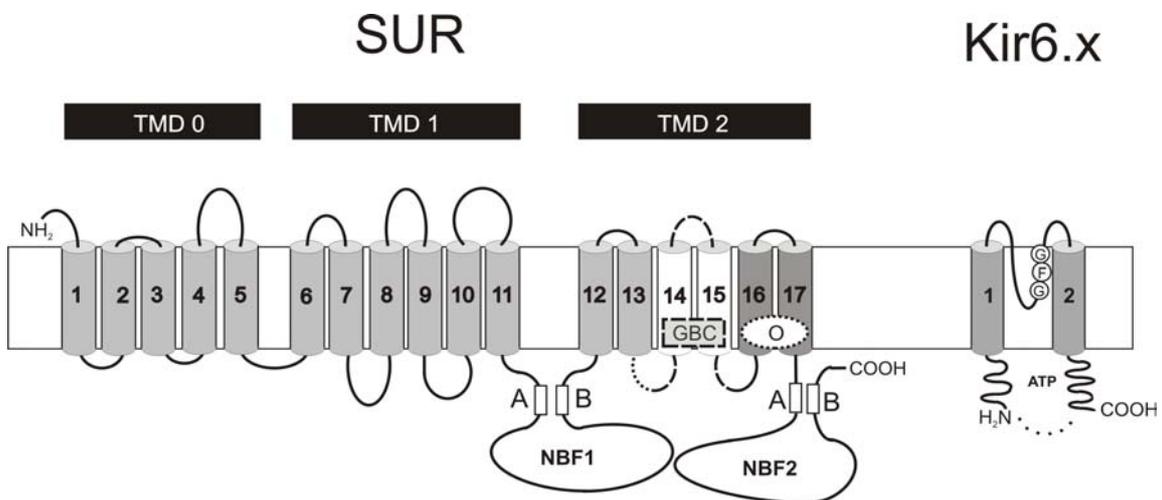


Abb. 1.5: Bildung von K_{ATP} -Kanälen durch Assoziation von Kir6.x-Untereinheiten mit Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SUR).

1.2.3.1 Die klassischen Kir-Kanäle (Kir2.x/IRKx)

Aufgrund ihrer Eigenschaft als starke Einwärtsgleichrichter werden Kir2.x-Kanäle bzw. IRKx (inward rectifier K⁺-channel) als „klassische Kir-Kanäle“ bezeichnet. Zu ihnen gehören die Vertreter aller Kir2.x-Untereinheiten: Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3 und Kir2.4.

1.2.3.1.1 Vorkommen und Funktion der Kir2.x-Kanäle

Die klassischen Kir2.x-Kanäle sind in fast allen lebenden Organismen in den unterschiedlichsten Geweben vorhanden (Bhandari und Hunter, 2001). Am besten charakterisiert sind die Kir2.x-Kanäle im Skelettmuskel des Frosches und im Seestern (Adrian, 1969; Hagiwara und Jaffe, 1979). Die eigentliche Charakteristik dieser Kanäle liegt in ihrer K⁺-Leitfähigkeit. Die Gleichrichtung, d.h. die Reduktion des Auswärtsstromes resultiert aus einem Block der Kanalpore durch intrazelluläres Mg²⁺ oder Polyamin (Spermin⁴⁺) (Doupnik et al., 1995; Nichols und Lopatin, 1997). Diese Kationen interagieren mit negativ geladenen Resten des M2-Segments oder der intrazellulär gelegenen Carboxylgruppe. Die Hemmung der Auswärtsströme durch die intrazellulären Kationen ist allerdings nicht konstant, sondern nimmt spannungsabhängig mit zunehmender Entfernung von E_K zu. Dies führt zu einer Strom-Spannungsbeziehung wie sie in Abb. 1.6 dargestellt ist. Bei Potentialen etwas positiv vom Gleichgewichtspotential für Kalium besitzen die Kanäle noch eine gewisse Leitfähigkeit, die dann bei zunehmender Depolarisation geringer wird. Sinn dieser Charakteristik ist,

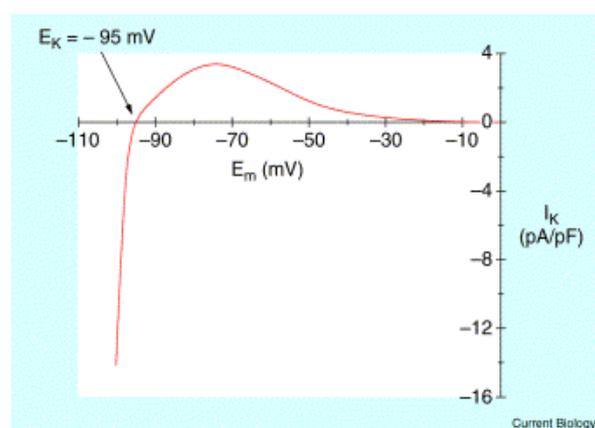


Abb. 1.6: Strom-Spannungsbeziehung eines Kir2x-Kanals unter physiologischen Bedingungen. (Graphik aus Jongasma und Wilders. *Current Biology* 11:R747-R750, 2001).

die Zelle auf einem Ruhemembranpotential nahe des E_K zu halten. Ist die Zelle aber für einen längeren Zeitraum stark depolarisiert, z.B. während der Plateauphase des Herzaktionspotentials, sind die Kanäle geschlossen, so daß es nicht zu hohen Kaliumverlusten der Zelle kommt. Die Kir2x-Kanäle können durch extrazelluläres Cs^{2+} und Ba^{2+} geblockt werden, was eine Depolarisation bewirkt. *In vivo* scheinen Kir2.x kontinuierlich aktiv zu sein. So spielen sie bei der Stabilisierung und der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials von Zellen sowie bei der Kontrolle der Erregbarkeit vieler Zelltypen, besonders im Herzen und im Gehirn, eine elementare Rolle (Nichols und Lopatin, 1997).

In glatten Muskelzellen von Gefäßen wird v.a. Kir2.1 eine Beteiligung an der Regulation des Gefäßtonus und des vaskulären Remodelings zugeschrieben (Zaritsky et al., 2000; Karkanis et al., 2003).

Auch in der Entwicklungsgeschichte des Organismus haben Kir2.x-Kanäle eine elementare Funktion. Fischer-Lougheed et al., 2001 zeigen die Rolle von Kir2.1 in der myoblastischen Fusion, die für die Entwicklung und die Reparatur des Skelettmuskels erforderlich ist. Darüber hinaus wird den Kir2.x-Subtypen eine Rolle in der Proliferation und Entwicklung von Zellen zugesprochen. Fehlende Proliferation, Differenzierung und Signalübertragung unterschiedlicher Zelltypen führten bei Kir2.1 Knockout-Mäusen zu einer 100 % Ausprägung einer Gaumenspalte mit konsekutiver perinataler Letalität durch Dehydratation und Ateminsuffizienz (Zaritsky et al., 2000). Interessanterweise zeigten die Mäuse außer der Gaumenspalte auch kardiale Symptome (Zaritsky et al., 2001), was in Verbindung mit kraniofaszialen Mißbildungen als „Syndrom“ bezeichnet wird (Ferguson, 1988). Das „Andersen-Tawil Syndrom“ ist eine seltene autosomal dominante Erbkrankheit mit charakteristischen kardialen Arrhythmien, periodischen Lähmung, kraniofaszialen Mißbildungen, dysmorphem Knochenbau sowie einer Gaumenspalte (Andersen et al., 1971; Tawil et al., 1994; Plaster et al., 2001). Klinisch zeigt der Phänotyp des Andersen's Syndroms dabei eine große Variabilität in der Ausprägung der Merkmale. Die Erbkrankheit wird durch Mutationen des Kir2.1-Gens verursacht (Preisig-Müller et al., 2002), deren Auswirkungen schon im Reifungs- und Transportprozeß (trafficking) des Kir2.1-Kanals liegen können (Bendahhou et al., 2003).

1.2.3.1.2 Molekulare Struktur der Kir2.x-Kanäle

Entsprechend der Homologie aller Kir-Kanäle entspricht die Porenregion der Kir2.x-Kanäle einer 2TM-1P-Topologie mit zwei Transmembransegmenten M1 und M2 und der extraplasmatischen Linkerregion (P-Loop oder H5; Abb. 1.4).

Im Gehirn der Ratte konnten bislang vier unterschiedliche Isoformen von Kir2.x nachgewiesen werden: Kir2.1 (Kubo et al., 1993), Kir2.2 (Takahashi et al., 1994), Kir2.3 (Morishige et al., 1994) und Kir2.4 (Topert et al., 1998).

Kir2.1 (IRK1; KCNJ2) ist ein Protein mit 427 Aminosäuren, dessen menschliches Gen KCNJ2 auf Chromosom 17, Position 17q23.1-q24.2 lokalisiert ist.

Kir2.2 (IRK2, KCNJ12) liegt als 432 Aminosäuren langes Kanalprotein ebenfalls auf Chromosom 17, mit dem Genlocus p11.2-11.1.

Kir2.3 (IRK3, KCNJ4) ist als menschliches Gen auf Chromosom 22, Position q13 lokalisiert.

Kir2.4 (IRK4; KCNJ14) konnte erst 1998 (Topert et al., 1998) entdeckt werden und sein Gen KCNJ14 liegt auf dem Genlocus 19q13.

Die funktionellen Kir2.x-Kanäle werden durch Assoziation von vier α -Untereinheiten zu einem Tetramerkomplex gebildet (Yang et al., 1995). Dieser Tetramerkomplex kann aus homomeren oder heteromeren Untereinheiten zusammengesetzt sein. Das funktionelle Vorkommen von Kir2.x als Homotetramer *in vivo* ist bekannt (Kondo et al., 1995). Die Existenz von funktionellen Heterotetrameren wurde jedoch lange kontrovers diskutiert. Nach Tinker et al., 1996 ist ein funktionelles Vorkommen von Heteromeren nicht möglich, in derselben Publikation zeigen sie jedoch eine Koprezipitation von Kir2.1- und Kir2.2-Untereinheiten. Fink et al., 1996 dagegen halten einen funktionellen Kanal von Kir2.1 und Kir2.3 für möglich. Eine Heteromerbildung von Kir2.1 und Kir2.4 mit stabilen Strömen wird von Schram et al., 2002 beschrieben. Weitere Heteromerbildung von Kir2.1 und Kir2.2 wird in Herzmuskelzellen beschrieben (Zaritsky et al., 2001; Zobel et al., 2003), wobei Kir2.1 die dominierende Rolle einnimmt (Picones et al., 2001; Melnyk et al., 2002). Die mögliche Heteromerbildung der Kir2.x-Kanäle könnte zum Auftreten des beschriebenen Phänotyps des Andersen-Tawil Syndroms führen (Preisig-Müller et al., 2002).

1.2.3.1.3 Gewebespezifische Verteilung der Kir2.x-Kanäle

Eine spezifische Verteilung der Untereinheiten des 2.x-Kanals kann v.a. im Gehirn und im Herz festgestellt werden. Die unterschiedliche Verteilung konnte durch Northern Blot Analyse, PCR, *in situ* Hybridisation, Immunhistologie und Patch-Clamp in Geweben der Maus, des Kaninchen, der Ratte, des Meerschweinchens wie auch des Menschen gezeigt werden.

Kir2.1 konnte v.a. im Gehirn (Karschin et al., 1997; Prüss et al., 2003) und in Herzmuskelzellen lokalisiert werden (Preisig-Müller et al., 1999; Zobel et al., 2003). Desweiteren wird eine Lokalisation in glatten Muskelzellen von Arterien und Bronchien (Robertson et al., 1996; Bradley et al., 1999; Oonuma et al., 2002) sowie in Endothelzellen (Liu et al., 2001) beschrieben.

Kir2.2 konnte im Gehirn (Prüss et al., 2003), in Herzmuskelzellen (Wible et al., 1995) und Endothelzellen (Liu et al., 2001) sowie im Skelettmuskel (Isomoto et al., 1997) nachgewiesen werden.

Kir2.3 ist überwiegend im Gehirn (Horio et al., 1996) und im Herzen (Morishige et al., 1994) sowie in Endothelzellen (Liu et al., 2001) lokalisiert.

Kir2.4 konnte bisher v.a. in Neuronen und cholinergen Interneuronen lokalisiert werden und scheint im peripheren und zentralen Nervensystem eine Rolle zu spielen (Liu et al., 2001; Prüss et al., 2003).

1.2.3.1.4 Zelluläre und pharmakologische Manipulation der Kir2.x-Kanäle

In den letzten Jahren gab es viele neue Informationen über mögliche Regulationen der Kir2x-Kanäle durch zelluläre und pharmakologische Modulatoren. So konnte festgestellt werden, daß alle Kir-Kanäle durch das Phospholipid PIP₂ der Zellmembran reguliert werden (Reimann und Ashcroft, 1999). Eine direkte Aktivierung des Kir2.3-Kanals durch Arachidonsäure, ein Phospholipid der Zellmembran, konnte nachgewiesen werden (Liu et al., 2001). Die meisten Kir2.x-Kanäle werden durch TEA (Tetraethylammonium) und 4-AP (4-Aminopyridin), in relativ hoher Konzentration, geblockt. Als direkter

Kanalblocker wirkt Nikotin auf Kir2.1 und Kir2.2 in Herzmuskelzellen. Der Kanalblock bewirkt eine Verlängerung des Aktionspotentials, was in Zusammenhang mit kardialen Arrhythmien steht (Wang et al., 2000). Die Pharmakologie der Kir2.x-Kanäle ist im Gegensatz zu den K_{ATP} -Kanälen jedoch nicht so reichhaltig.

1.2.3.2 Die K_{ATP} -Kanäle

K_{ATP} -Kanäle sind bedeutend als metabolische Sensoren, die die zelluläre Erregbarkeit an den metabolischen Zustand der Zelle anpassen. Zudem besitzen sie eine reichhaltige Pharmakologie.

1.2.3.2.1 Vorkommen und Funktion der K_{ATP} -Kanäle

Die K_{ATP} -Kanäle sind metabolisch regulierte Kanäle, deren Aktivität durch intrazelluläres ATP gehemmt wird. Während intrazelluläres ATP diese Kanäle schließt, werden sie durch zytoplasmatische Magnesiumnukleosiddiphosphate geöffnet. Dadurch verbinden sie den intrazellulären metabolischen Zustand der Zelle mit der elektrischen Aktivität der Zellmembran, was für die Physiologie und Pathophysiologie der Zelle entscheidend ist. In den meisten Geweben liegen die K_{ATP} -Kanäle unter physiologischen Bedingungen überwiegend geschlossen vor. Das bedeutet, daß sie, im Gegensatz zu den Kir2.x-Kanälen, eine untergeordnete Rolle in der Aufrechterhaltung des Ruhe- und Aktionspotential einnehmen. Vielmehr wird ihnen eine Art protektiver Notfallmechanismus zugesprochen. Unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen wird das Aktionspotential verkürzt, die Kontraktilität der Zelle erniedrigt und somit der Energieverbrauch der Zelle reduziert.

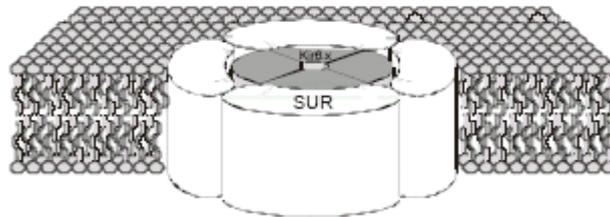
K_{ATP} -Kanäle sind in einer Reihe unterschiedlicher Gewebe und Zelltypen verbreitet, wo sie sich sowohl in der Zellmembran als auch intrazellulär, z.B in der Mitochondrienmembran (Inoue et al., 1991), befinden. Entdeckt wurden sie in

Herzmuskelzellen (Noma, 1983), konnten kurz darauf aber auch in den β -Zellen des Pankreas (Cook und Hales, 1984) und vielen anderen Geweben nachgewiesen werden (Ashcroft und Ashcroft, 1990; Edwards und Weston, 1994; Quast, 1996). Die Öffnung von K_{ATP} -Kanälen führt zu einer Verschiebung des Membranpotentials in Richtung des Kalium-Gleichgewichtspotentials von ~ 90 mV. Am besten untersucht und verstanden ist die Funktion von K_{ATP} -Kanälen in den β -Zellen des Pankreas. Bei verminderter Glucosekonzentration wird das Verhältnis von ATP zu ADP in den Zellen erniedrigt. Dies führt zu einer Öffnung der K_{ATP} -Kanäle mit konsekutiver Hyperpolarisation, was die Ca^{2+} -Konzentration senkt. Als Folge davon wird die Insulinausschüttung reduziert; umgekehrt verstärkt eine Erhöhung der Glucosekonzentration die Insulinausschüttung (Ashcroft und Gribble, 1999).

In reninsezernierenden Zellen bewirkt diese Hyperpolarisation bei verminderter Ca^{2+} -Konzentration hingegen eine Steigerung der Reninsekretion (Osswald und Quast, 1995). Im Sarkolemma des Herzmuskels sind die K_{ATP} -Kanäle an der Verkürzung des Aktionspotentials während der Ischämie beteiligt (Nichols und Lederer, 1991), die physiologische Bedeutung dieser Reaktion ist aber umstritten. Neuere Daten mit Knockout-Mäusen deuten allerdings auf eine Rolle dieses Kanals auch unter normalen physiologischen Bedingungen hin (Kane et al., 2004). In der Skelettmuskulatur haben K_{ATP} -Kanäle wahrscheinlich eine Schutzfunktion bei Ischämie und Erschöpfung. Weiterhin spielen sie nach Chutkow et al., 2001 eine Rolle bei der Regulation der Glukosekonzentration in der Skelettmuskulatur. In der glatten Gefäßmuskulatur regulieren K_{ATP} -Kanäle den Gefäßtonus (Quast, 1993) und haben eine Schutzfunktion vor Koronarspasmen, ähnlich der Prinzmetal Angina (Seino und Miki, 2003). Analog zum Herzen wird für die K_{ATP} -Kanäle in Neuronen eine protektive Wirkung bei cerebralen Ischämien angenommen. Genauer untersucht wurde das Verhalten der Neurone in der Substantia nigra bei Wildtyp- bzw. Kir6.2-Knockout-Mäusen. Die erhöhte Erregbarkeit dieses Hirnteils führte bei Knockout-Mäusen durch Sauerstoffmangel zu schweren Krämpfen mit Todesfolge (Yamada et al., 2001). Unabhängig von der Gewebeart wird K_{ATP} -Kanälen eine Rolle bei der Steuerung der Zellproliferation zugeschrieben (Malhi et al., 2000).

1.2.3.2.2 Molekulare Struktur der K_{ATP} -Kanäle

Wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, liegt der funktionelle K_{ATP} -Kanal als oktamerer Gesamtkomplex $(SUR/Kir6.x)_4$ in der Zellmembran vor (Abb. 1.7).



Von der α -Untereinheit Kir6x existieren zwei Subtypen, Kir6.1 und Kir6.2. Ihre kodierten Gene

Abb. 1.7: Schematische Darstellung des oktameren Kir6.x/SUR Komplexes in der Plasmamembran.

stimmen bezüglich der Aminosäuresequenzen zu ca. 70 % überein, wobei Kir6.1 eine geringere Leitfähigkeit als Kir6.2 besitzt und weniger empfindlich auf ATP reagiert. Das menschliche Gen für Kir6.1 (KCNJ8) ist ca. 9,7 kb lang und auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 an Position p11.23 lokalisiert. Es besitzt drei Exons, die Kir6.1 mit 424 Aminosäuren und 45 kDa kodieren. Kir6.1 kann sowohl mit SUR1 als auch SUR2A und 2B funktionelle K_{ATP} -Kanäle bilden. Der Subtyp Kir6.2 ist ein 390 Aminosäuren langes Protein, dessen Gen (KCNJ11) beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 liegt.

Der SUR, der die β -Untereinheit des Kaliumkanals bildet, spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der Kanalaktivität. Auf ihm liegen die Bindungsstellen für Öffner (z.B. Pinacidil) und Blocker (Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid).

1995 konnte der SUR erstmals aus der β -Zelle des Pankreas kloniert werden (Aguilar-Bryan et al., 1995). Eine angenommene Präsenz des SUR in der afferenten Arteriole (Metzger und Quast, 1996; Metzger et al., 1997) konnte durch Existenz des SUR2B als Komponente des K_{ATP} -Kanals (Yamada et al., 1997) bestätigt werden. Russ et al., 1999 konnten die Hyperpolarisation durch K_{ATP} -Kanalöffner mit Sulfonylharnstoffen an der afferenten Arteriole verhindern. Von SUR existieren zwei Subtypen, SUR1 und SUR2 (Aguilar-Bryan et al., 1995; Isomoto et al., 1996). Durch alternatives Spleißen entstanden die Varianten SUR2A und SUR2B. Weitere Spleißvarianten von SUR1 (Sakura et al., 1999, Hambrook et al., 2002) und SUR2 (Babenko et al., 1998; Chutkow et al., 1999; Szamosfalvi et al., 2002) wurden beschrieben.

1.2.3.2.3 Gewebespezifische Verteilung der K_{ATP} -Untereinheiten

Je nach Kombination der Kir- und SUR-Untereinheiten werden die Eigenschaften der K_{ATP} -Kanäle in dem jeweilig lokalisierten Gewebe unterschiedlich geprägt.

Kir6.1, dessen ursprünglicher Name „ubiquitous expressed ATP-sensitive potassium channel“ (uKATP-1; Inagaki et al., 1995b) war, ist in vielen Geweben lokalisiert. Er gilt als die dominierende α -Untereinheit der K_{ATP} -Kanäle in der glatten Muskulatur der Gefäße (Yamada et al., 1997; Thorneloe et al., 2002), während in anderen glatten Muskeln wahrscheinlich Kir6.1 und Kir6.2 als Heterotetramere vorliegen.

Kir6.2 ist hauptsächlich in den β -Zellen des Pankreas, im Herzen, im Gehirn, in Skelettmuskeln und in nichtvaskulären glatten Muskeln vorhanden (Inagaki et al., 1995a).

SUR1 gilt als die regulierende Untereinheit des K_{ATP} -Kanals in den β -Zellen des Pankreas und in den meisten Neuronen (Aguilar-Bryan et al., 1995; Inagaki et al., 1995a; Liss und Roeper, 2001).

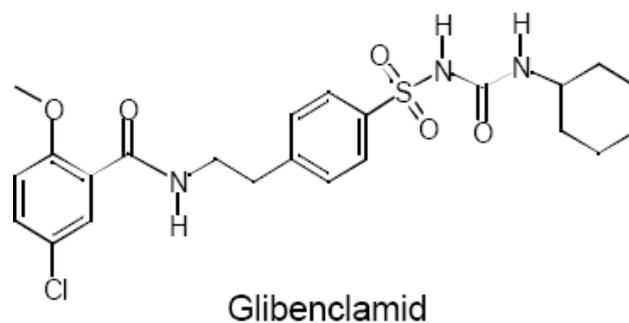
SUR2A ist charakteristisch für Herz- und Skelettmuskulatur (Inagaki et al., 1996).

SUR2B lokalisiert sich überwiegend in der glatten Muskulatur sowie in Neuronen (Isomoto et al., 1996; Yokoshiki et al., 1998; Seino, 1999; Thorneloe et al., 2002).

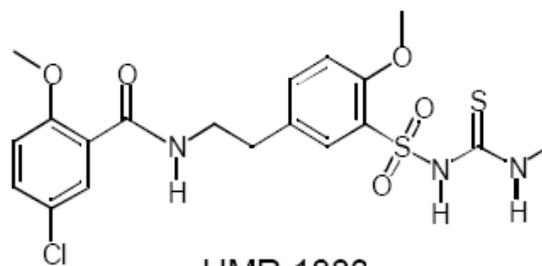
1.2.3.2.4 Pharmakologie der K_{ATP} -Kanäle

K_{ATP} -Kanäle sind der Angriffsort wichtiger Substanzen. So gibt es Substanzen, welche die „Offenwahrscheinlichkeit“ der Kanäle erhöhen (K_{ATP} -Kanalöffner), und welche, die diese erniedrigen (K_{ATP} -Kanalblocker). Als K_{ATP} -Kanalblocker werden meist Sulfonylharnstoffe verwendet. Die Bindungsstelle der Sulfonylharnstoffe ist dabei mit der Öffnerbindungsstelle negativ allosterisch gekoppelt (Bray und Quast, 1992).

Der klassische Sulfonylharnstoff Glibenclamid (Euglucon®, Abb. 1.8) ist ein häufig eingesetztes orales Antidiabetikum bei Typ II-Diabetes. Wie die meisten Sulfonylharnstoffe wirkt es hauptsächlich auf die β -Zellen des Pankreas, zusätzlich besitzt es einen extrapancreatischen Effekt. Der Sulfonylthioharnstoff HMR 1883 hingegen entfaltet seine höchste Wirksamkeit am kardialen K_{ATP} -Kanal, wo er tödliches Herzflimmern im Ventrikel verhindern soll (Gögelein et al., 2000). Zu den



Glibenclamid



HMR 1883

Abb. 1.8: Chemische Struktur der K_{ATP} -Kanalblocker Glibenclamid und HMR 1883 (aus Russ et al. 2001).

Kaliumkanalöffnern gehören Substanzen verschiedener Stoffklassen, wie Pinacidil, Levromakalim, Diazoxid und Minoxidilsulfat. Sie besitzen ein relativ breites therapeutisches Spektrum in der Behandlung verschiedenster Erkrankungen wie des Bluthochdrucks (Diazoxid, Minoxidilsulfat), der Erbkrankheit PHHI (familiar persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy; Diazoxid), der akuten und chronischen myokardialen Ischämie, der Inkontinenz sowie des Asthma bronchiale (Quast, 1992; Isomoto und Kurachi, 1997; Buchheit et al., 2002). Sogar als Haarwuchsmittel werden sie als Externa eingesetzt (Regaine®, Minoxidilsulfat). Eine breite therapeutische Anwendung der Öffner wird jedoch durch die mangelnde Selektivität der Substanzen verhindert.

1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS; Abb. 1.9) kommt neben dem Sympathikus eine zentrale Bedeutung in der Regulation des Blutdrucks sowie des Salz- und Wasserhaushalts (Hackenthal et al., 1990) zu.

Das RAAS wird bei einer Abnahme des Plasmavolumens, einem Blutdruckabfall, bei Salzzug und bestimmten Formen der Hypertonie aktiviert. Durch die Aktivierung des RAAS wird ein Anstieg des arteriellen Blutdruck, des Herzminutenvolumens sowie der kardialen Vor- und Nachlast bewirkt.

Im folgenden werden die Komponenten des RAAS sowie deren Zusammenwirken erläutert.

Renin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 37-40 kDa, das hauptsächlich in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet und gespeichert wird. Es wird als Präprorenin aus 406 Aminosäuren synthetisiert und in das inaktive Prorenin umgewandelt. Durch Abspaltung von 43 Aminosäuren am N-terminalen Ende des Prorenins wird das inaktive Prorenin in die aktive Form des Renins als Protease aus 340 Aminosäuren überführt.

Renin besitzt eine hohe Spezifität gegenüber seinem einzigen bekannten Substrat, dem hauptsächlich in der Leber gebildeten α_2 -Glykoprotein Angiotensinogen. In seiner Funktion als Aspartyl-Protease spaltet Renin von Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) ab. Angiotensin I wird durch Abspalten eines carboxyterminalen Dipeptids mit Hilfe der im Blut und der Lunge vorhandenen Protease Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) in das hochaktive Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) überführt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in dieser Reaktionskette wird durch Renin katalysiert, was auf die zentrale Rolle dieses Enzyms hinweist.

Angiotensin II (ANG II) ist das wichtigste Effektorpeptid des RAAS, welches die Aktivität des Sympathikus und die Na^+ -Rückresorption in den Nierentubuli erhöht sowie direkt am Gefäß vasokonstriktorisch wirkt. Darüber hinaus inhibiert Angiotensin II über einen negativen Feedback-Mechanismus die Reninsekretion und stimuliert die Synthese und Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde.

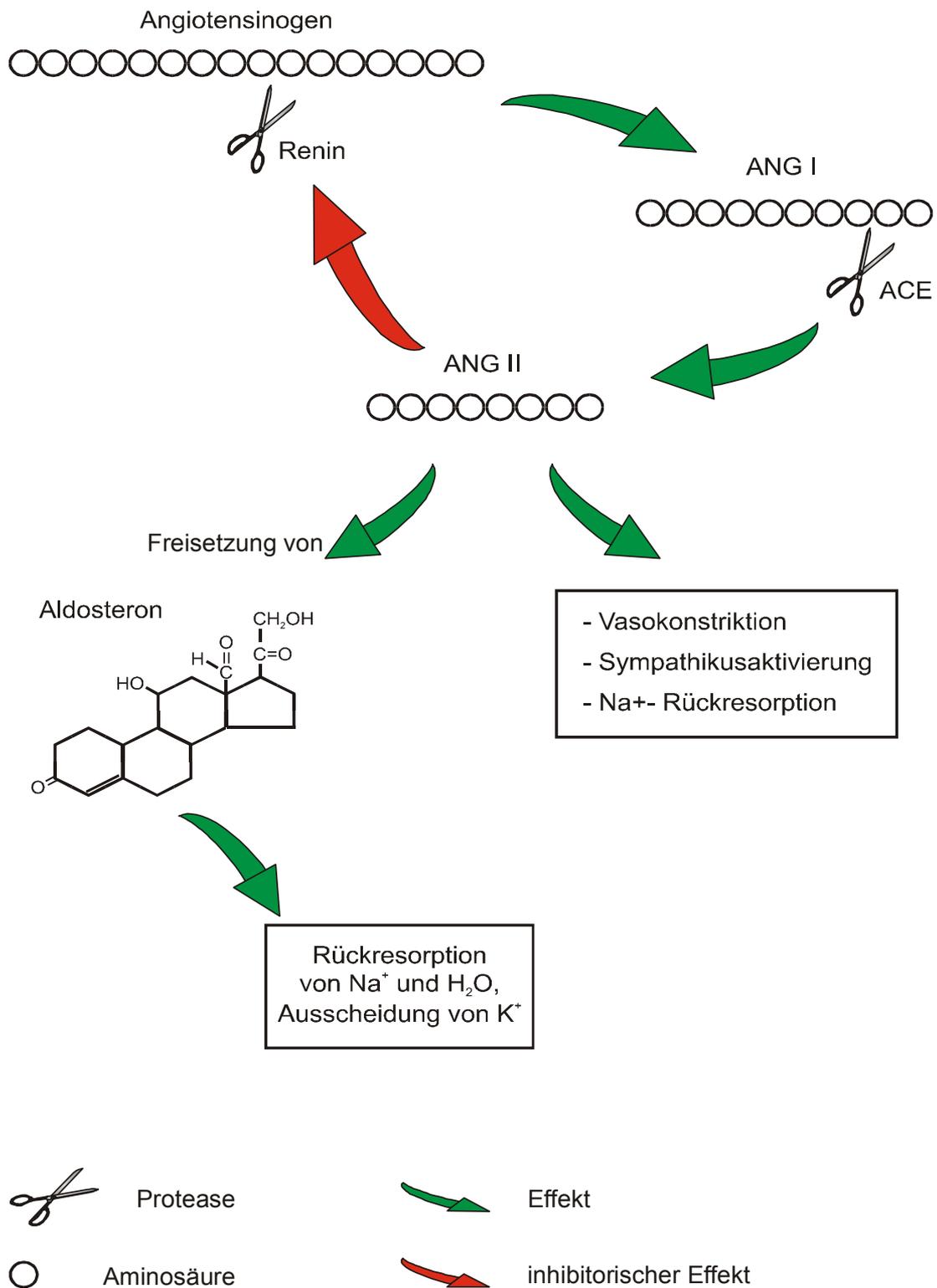


Abb. 1.9: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (nach Rauch, 2000)

Das Mineralkortikoid Aldosteron bewirkt eine Erhöhung der Na^+ - und Wasserrückresorption im distalen Nierentubulus. Dadurch kommt es zu einer Zunahme des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens sowie einer kompensatorischen K^+ -Ausscheidung.

Die Aktivität des RAAS wird hauptsächlich über die Sekretionsrate des Renins moduliert (Hackenthal et al., 1990), so daß alle Faktoren, die auf die Reninsekretion einwirken, über das RAAS direkt oder indirekt auf den Blutdruck sowie das Wasser- und Elektrolytgleichgewicht des ganzen Organismus Einfluß nehmen.

1.4 Aufbau der Niere

Über die Regelmechanismen des Wasser- und Elektrolythaushaltes und die Synthese und Freisetzung von vasoaktiven Hormonen durch das RAAS kommt der Niere eine zentrale Funktion in der Blutdruckregulation zu.

Ferner ist die Niere das wichtigste Ausscheidungsorgan für Stoffwechselprodukte und Fremdstoffe des Körpers. Ihre Funktion und Regulation sind komplex und mit der anatomischen Struktur der Niere eng verbunden.

Die Niere ist paarig angelegt und liegt im Retroperitonealraum. An einer Schnittfläche durch die Niere lassen sich Mark (medulla) und Rinde (Cortex) unterscheiden. Die Funktionseinheit der Niere ist das Nephron. Jede Niere hat ca. 1,2 Millionen Nephrone, die bei Geburt angelegt sind und nicht regeneriert werden können. Das Nephron setzt sich aus einem Glomerulum mit Bowman'scher Kapsel und dem sich anschließenden Tubulusapparat sowie Gefäßen zusammen.

Das Glomerulum besteht aus einem Kapillarnetz, das sich in den blindsackartigen Ursprung des Tubulussystems einstülpt. Hierdurch entsteht aus der eingestülpten Wand des Tubulussystems die Bowman'sche Kapsel, die das Glomerulum umhüllt. Das innere Blatt der Bowman'schen Kapsel wird von verzweigten Deckzellen (Podozyten und Epizyten) gebildet. Zwischen den Kapillarschlingen des Kapillarnetz liegen die Mesangiumzellen. Die

Glomerulumkapillaren sind aus einer dünnen Epithelschicht und einer dicken Basalmembran aufgebaut. Auf der Basalmembran liegen außen die Podozyten, die mit ihren Fortsätzen untereinander in Verbindung stehen. Endothel, Basalmembran und Podozyten bilden eine Blut-Harn-Schranke, durch die der Primärharn aus der Kapillarschlinge in die Bowmansch'sche Kapsel abgepreßt wird.

Die Besonderheit des Gefäßsystems der Niere sind die zwei hintereinandergeschalteten Kapillarnetze. Die Blutversorgung erfolgt durch die Arteria renalis, die aus der Aorta entstammt und sich nach ihrem Eintritt in die Niere in die Arteriae interlobares, daraus in die Arteriae arcuatae und schließlich die Arteriae interlobularis verzweigt. Die Arteriae interlobularis ziehen senkrecht zur Nierenkapsel und geben dabei zahlreiche afferente Arteriolen (Vasa afferentia) ab. Die afferenten Arteriolen, die die einzelnen Nierenkörperchen versorgen, bilden innerhalb des Glomerulums ein Kapillarnetz und vereinigen sich wieder in den efferenten Arteriolen (Vas efferens). Anschließend ziehen sie aus den Glomeruli und bilden um die Tubuli ein weiteres „echtes“ Kapillarnetz, das als venöses System in die Vena interlobularis übergeht und schließlich in der Vena renalis mündet.

Das Tubulussystem wird unterteilt in den proximalen Tubulus, die Henle'sche Schleife und den distalen Tubulus, der in das Sammelrohr mündet. Am Harnpol gegenüber des Gefäßpols im Glomerulum beginnt der proximale Tubulus mit seinem gewundenen Teil (proximale Konvolut), der in den geraden Teil des proximalen Tubuls übergeht. Er besitzt ein hochzylindrisches Epithel, das mit einem Bürstensaum (Mikrovilli) besetzt ist. Der proximale Tubulus resorbiert Glukose, Natrium, Chlorid, Kalium, Harnsäure und Wasser aus dem Lumen zurück und gibt harnfähige Substanzen ins Lumen ab. Daran schließt sich die Henle-Schleife an, die sich in Form einer Haarnadel in einen absteigenden Ast, ein Überleitungsstück sowie einen dünnen und dicken aufsteigenden Ast untergliedert. Die Henle-Schleife besitzt ein hell aussehendes flaches Epithel. Ihre Funktion dient v.a. der Harnaufkonzentrierung und der Reabsorption (~25%) als sogenanntes „Haarnadel-Gegenstrom-Prinzip“.

Der distale Tubulus kehrt als Fortsetzung des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife (TALH) wieder zum zugehörigen Glomerulum zurück und geht dann in das Sammelrohr über, das als Ausführungsgangsystem des Harns in die Nierenkelche dient. Das Epithel des distalen Tubulus ist heller und niedriger als im proximalen Tubulus. In diesem Teil wird v.a. Natrium gegen Kalium ausgetauscht.

Die Stelle an der der distale Tubulus den Gefäßpol des zugehörigen Glomerulums berührt, wird als Macula densa bezeichnet. Diese spezialisierten Zellen sind an der Bildung des funktionellen juxtaglomerulären Apparates beteiligt und bewirken über eine Messung der NaCl-Konzentration an der Kontaktstelle eine Anpassung der Reninsekretion.

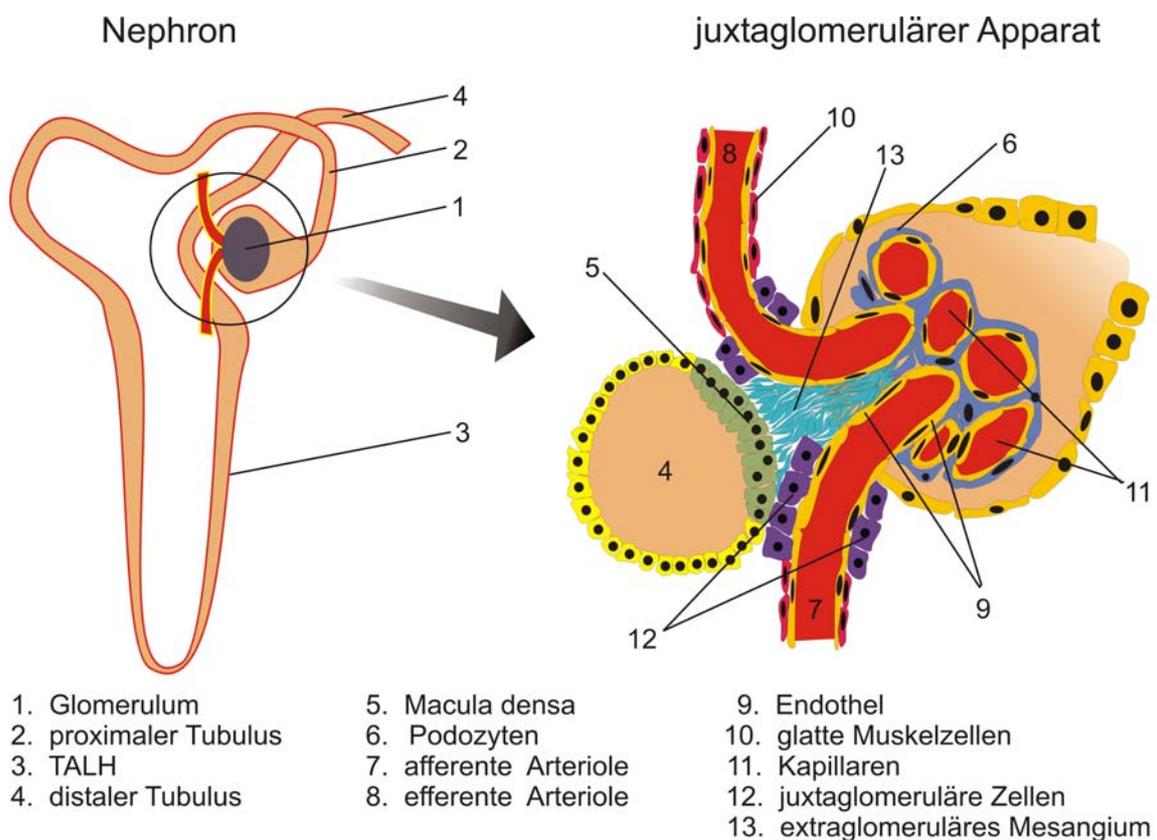


Abb. 1.10: Schematischer Querschnitt durch ein Glomerulum und den juxtaglomerulären Apparat (Zeichnung modifiziert von einem Original nach Marc Chmielnicki, Tübingen).

1.5 Der juxtaglomeruläre Apparat: Lokalisation und Synthese von Renin

Die funktionelle Einheit des juxtaglomerulären Apparats (JGA) wird von reninsezernierenden Zellen, in diesem Bereich reninhaltige juxtaglomeruläre Zellen (JGZ) genannt, den Macula densa Zellen (MD) des distalen Tubulus und den extraglomerulären Mesangiumzellen (EGM) gebildet (Abb. 1.10).

Renin wird hauptsächlich in den reninhaltigen juxtaglomerulären Zellen gebildet, die zum größten Teil in der Media der afferenten Arteriole im juxtaglomerulären Apparat lokalisiert sind (Hackenthal et al., 1990). Die Anzahl der reninpositiven Zellen der efferenten Arteriole ist hingegen gering (Taugner et al., 1982; Hackenthal et al., 1990). Die afferenten Arteriolen sind aus der Tunica intima (eine Endothelzellschicht und Elastinschicht), der einschichtigen Tunica media und der Tunica adventitia aufgebaut. Sie werden, aufgrund der dort anzutreffenden Zellen in einen proximalen und einen distalen Teil untergliedert. Im proximalen Abschnitt wird die Media ausschließlich von glatten Muskelzellen gebildet, die ringförmig den innen liegenden Endothelschlauch umgeben. Im distalen Abschnitt befinden sich neben glatten Muskelzellen die reninsezernierenden Zellen, die in mehreren Lagen übereinander angeordnet sein können (Gattone et al., 1984). Wenngleich die meisten reninsezernierenden Zellen eine Art Manschette um den Pol der afferenten Arteriole bilden, können sie auch weiter proximal nachgewiesen werden (Bührle et al., 1984). Bezüglich der Länge des reninpositiven Bereichs der Arteriole gibt es nicht nur Unterschiede zwischen Tieren verschiedener Arten oder Tieren einer Art, sondern auch zwischen afferenten Arteriolen eines Tieres (Taugner et al., 1982; Bührle et al., 1984). Die Anzahl der reninsezernierenden Zellen in einer Arteriole bleibt ebenfalls nicht konstant. So kann es als Anpassung an sich ändernde physiologische Bedingungen (z.B. salzarme Nahrung) zu einer Umwandlung von weiter proximal gelegenen glatten Muskelzellen in reninsezernierende Zellen kommen und *vice versa* (Cantin et al., 1977; Sequeira Lopez et al., 2001). Daraus wird auch deutlich, daß es zu jeder Zeit intermediäre (teilweise umgewandelte) Zellen gibt, die hinsichtlich ihrer Morphologie und Funktion zwischen glatten Muskelzellen und voll entwickelten

reninsezernierenden Zellen stehen (Hackenthal et al., 1990). Auch diese intermediären Zellen sind wie die glatten Muskelzellen ringförmig um den Endothelschlauch angeordnet, besitzen Myofilamente und zusätzlich Reningranula. Im Gegensatz dazu sind die relativ plumpen reninsezernierenden juxtaglomerulären Zellen mit zahlreichen Fortsätzen versehen, weisen kaum Myofilamente auf und haben in ihrem Cytoplasma viele Reningranula eingelagert (Hackenthal et al., 1990). Die komplexe Anatomie des juxtaglomerulären Apparates deutet dabei auf multiple Mechanismen hin, die an der Regulation der Reninsekretion beteiligt sind.

1.6 Regulation der Reninsekretion

Die Mechanismen, die die Reninsekretion kontrollieren, können in drei Ebenen untergliedert werden, die physiologische bzw. den Gesamtorganismus betreffende Ebene, die Ebene der Botenstoffe und Mediatoren sowie die auf zellulärer Ebene wirksamen Faktoren. Die Übergänge zwischen der zweiten und dritten Ebene sind fließend.

Zunächst gibt es die physiologische Betrachtungsweise auf der Ebene des Gesamtorganismus, an der drei Mechanismen angreifen:

- die renale sympathische Innervierung
- der Macula densa-Mechanismus
- der Barorezeptor-Mechanismus.

Auf der darunterliegenden Ebene kann man solche Faktoren zusammenfassen, die als Botenstoffe und Mediatoren verwendet werden, wie

- Angiotensin II,
- Adenosin,
- NO sowie
- Arachidonsäure und ihre Metabolite

Die bedeutenden Faktoren auf zellulärer Ebene sind:

- Ca^{2+} ,
- cAMP,
- cGMP,
- Osmolalität und
- Membranpotential

In dieser Arbeit sollten die Kaliumkanäle, die das Membranpotential der JGZ bestimmen, genauer untersucht werden.

1.7 Das Membranpotential in reninsezernierenden Zellen

Das Ruhemembranpotential der reninsezernierenden juxtaglomerulären Zellen in afferenten Arteriolen beträgt ~ 60 mV (Fishman, 1976 (zwei Populationen mit -70 und -35 mV); Bührle et al., 1985; Kurtz und Penner, 1989; Russ et al., 1999). Isolierte juxtaglomeruläre Zellen von Rattennieren sind hingegen stärker depolarisiert (-32 mV, Friis et al., 2003). Das Membranpotential in reninsezernierenden Zellen kann sowohl in hyperpolarisierende als auch in depolarisierende Richtung verschoben werden.

Als wichtiger depolarisierender Effekt wirkt die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration $[\text{K}^+]_o$, was an reninsezernierenden Zellen der Maus gezeigt werden konnte (Fishman, 1976; Kurtz et al., 1990). Depolarisation mit Kalium bewirkt weiterhin eine Hemmung der Reninsekretion, was an isolierten perfundierten Rattennieren sowie an Nierenschnitten von Ratte, Schwein, Hund und Kaninchen gezeigt werden konnte (Übersicht in Churchill, 1985). Dieser hemmende Effekt ist von einem Ca^{2+} -Einstrom begleitet und kann durch einen Block der spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanäle verhindert werden (Übersicht in Churchill, 1985). In Arbeiten von Kurtz und Penner, 1989 konnten in patch-clamp-Messungen jedoch keine spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle in reninsezernierenden Zellen nachgewiesen werden. Nach Depolarisation mit

erhöhtem $[K^+]_o$ konnte konsequenter Weise weder eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ noch eine Hemmung der Reninsekretion gefunden werden (Kurtz et al., 1990). Diese Befunde sind allerdings nicht unumstritten. Zum Beispiel fanden Russ et al., 1999 funktionelle Hinweise auf die Existenz von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen. Diese wurden auch mit PCR in isolierten JGZ nachgewiesen (Friis et al., 2003).

Zur Depolarisation der Zellen führt auch die Stimulation mit physiologischen, vasokonstriktiven Substanzen wie Adrenalin, Noradrenalin und Angiotensin II (Bührle et al., 1984; Bührle et al., 1986; Kurtz und Penner, 1989), die zudem eine Hemmung der Reninsekretion bewirkt (Bührle et al., 1986). Zugleich führen vasokonstriktive Substanzen wie ANG II zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in reninsezernierenden Zellen (Kurtz und Penner, 1989; Rauch, 2000). Eine Hemmung dieser beobachteten Effekte auf die Reninsekretion wurde durch gleichzeitige Gabe eines Ca^{2+} -Kanalblockers (Verapamil) beschrieben (Kurtz, 1989).

Hierbei soll die Bedeutung des „Calcium-Paradox“ (Churchill, 1985) bei der Kontrolle der Reninsekretion erwähnt werden, das eine inverse Beziehung zwischen Calcium und der Reninsekretion beschreibt. In Experimenten, in denen eine Hyperpolarisation zu einer Erniedrigung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ führte, konnte eine Steigerung der Reninsekretion in juxtaglomerulären Zellen beobachtet werden (Kurtz, 1989; Hackenthal et al., 1990). Umgekehrt führt eine Depolarisation der juxtaglomerulären Zellen zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration (Russ et al., 1999) und zu einer Erniedrigung der Reninsekretion (Kurtz, 1989). Die Rolle des Ca^{2+} in der Reninsekretion ist aber umstritten, u.a. da eine Sekretionssteigerung in Zellen typischerweise mit einem Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ verbunden ist. Folglich kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob $[Ca^{2+}]_i$ einen direkten Einfluß auf die Reninsekretion ausübt, oder ob nicht umgekehrt die Membrandepolarisation selbst das entscheidende Kriterium ist und die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ in diesem Zusammenhang eher unbedeutend ist (Kurtz et al., 2000).

Umgekehrt gibt es wegweisende Ergebnisse, daß eine Hyperpolarisation der Membran von reninsezernierenden Zellen zu einer Steigerung der Reninsekretion führt.

Eine wichtige Rolle spielen dabei die K_{ATP} -Kanalöffner (Abb. 1.11). Durch Bindung an den ATP-sensitiven Kaliumkanal bewirken sie eine Hyperpolarisation der Zelle (Kurtz et al., 1990; Ashcroft und Ashcroft, 1990; Quast et al., 1995; Quast et al., 1996). Russ et al., 1999 konnten diese Beobachtungen an isolierten afferenten Arteriolen der Ratte nachweisen. Bei Gabe des K_{ATP} -Kanalöffners Cromakalim konnte eine konzentrationsabhängige Stimulation der Reninsekretion bei gesunden Probanden sowie an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte nachgewiesen werden (Ferrier et al., 1989). Dies konnte an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte (Jensen et al., 1998; Vallon et al., 1998), an isolierten afferenten Arteriolen und an perfundierten Rattennieren (Jensen et al., 1998) bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den K_{ATP} -Kanalöffnern bewirken K_{ATP} -Kanalblocker wie der klassische Sulfonylharnstoff Glibenclamid eine Hemmung der Reninsekretion *in vivo* (Richer et al., 1990; Pratz et al., 1991; Jensen et al., 1998). *In vitro* hingegen konnte kein Effekt von Glibenclamid auf das Ruhemembranpotential gezeigt werden (Russ et al., 1999). Der genaue Mechanismus der K_{ATP} -Kanäle bei der Reninsekretion bleibt jedoch unklar.

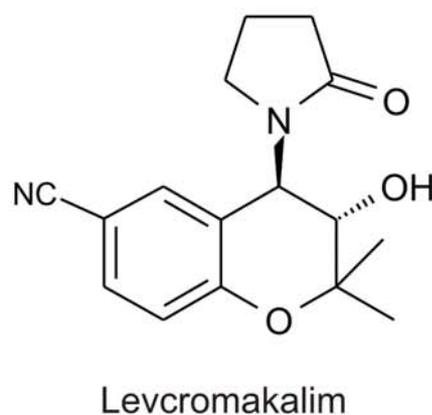
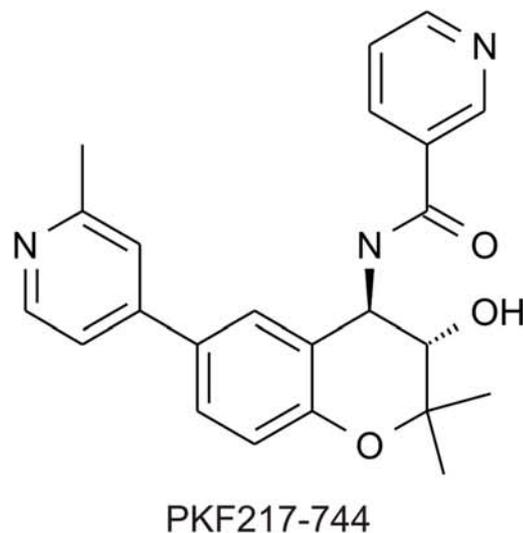
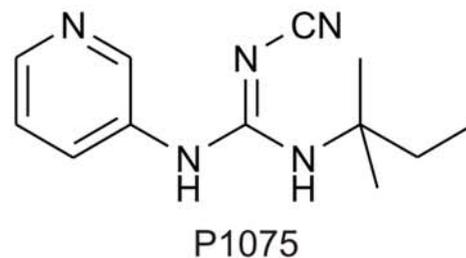
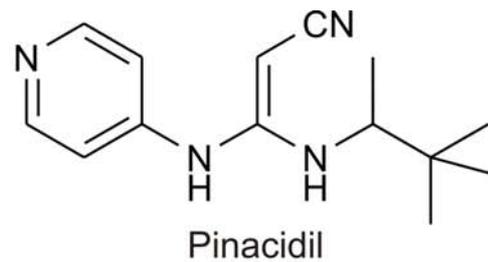


Abb. 1.11: Chemische Struktur wichtiger K_{ATP} -Kanalöffner und des bekanntesten Cyanoguanidins Pinacidil.

Eine Hyperpolarisation der reninsezernierenden Zellen wird neben den K_{ATP} -Kanalöffnern durch physiologische Stimuli beschrieben. Fishman, 1976 beschreibt eine Hyperpolarisation der Zellen bei Gabe des β_1 -Agonisten Adrenalin. Dieser hyperpolarisierende Einfluß von β -adrenergen Substanzen, die die Reninsekretion nachgewiesenermaßen stimulieren, konnte jedoch von Bührle et al., 1986 und Laske-Ernst, 2003 nicht bestätigt werden.

Desweiteren sind reninsezernierende Zellen sowohl mit den glatten Muskelzellen als auch mit den EGM und den Endothelzellen über gap junctions verbunden (Lorenz et al., 1993 nach Forssmann und Taugner, 1977; Hackenthal et al., 1990 nach Taugner und Hackenthal, 1989), was eine starke elektrische Kopplung zwischen diesen Zellen nach sich zieht (Kurtz und Penner, 1989; Russ et al., 1999). Dies bedeutet, daß bei Experimenten mit isolierten afferenten Arteriolen die gap junctions stets entkoppelt sein müssten, um sicherzugehen, daß die beobachtete Reaktion durch die reninsezernierende Zelle direkt verursacht wird.

Zur Bedeutung des Membranpotentials für die Reninsekretion wurden weitere elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. In einer wegbahnenden Studie konnten Kurtz und Penner, 1989 einen starken einwärtsgerichteten Kaliumstrom in reninsezernierenden juxtaglomerulären Zellen des distalen Anteils der afferenten Arteriole einer Maus nachweisen. Dies konnte in der afferenten Arteriole einer Rattenniere von Loutzenhiser et al., 1997 und Chilton und Loutzenhiser, 2001 sowie an juxtaglomerulären Zellen und der afferenten Arteriole von NaCl-arm und normal ernährten Ratten (Leichtle et al., 2004) bestätigt werden, die diesem Strom eine entscheidende Rolle für das Membranpotential zuweisen.

1.8 Fragestellung

In dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

1.) Kann die von Russ et al., 1999 aus elektrophysiologischen Messungen geforderte Kir6.1-Kanaluntereinheit an afferenten Arteriolen der Ratte auch als Protein nachgewiesen werden?

2.) Kann dem einwärtsgerichteten Kaliumstrom, der für das Ruhemembranpotential der JGZ hauptverantwortlich ist (Kurtz und Penner, 1989; Chilton und Loutzenhiser, 2001; Russ et al., 2003b) ein entsprechender Kaliumkanal auf RNA- und Proteinebene zugeordnet werden?

Hierbei ist v.a. von Bedeutung welche der in Frage kommenden Kir2.x-Subtypen (Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3) in den JGZ exprimiert werden? Neben dem grundsätzlichen Nachweis ist auch die Lokalisation der Kanäle in der Niere sowie die Expressionsstärke der einzelnen Kanäle von Bedeutung. Daraus lassen sich dann Rückschlüsse ziehen auf die dominierende Kanaluntereinheit bzw. auf mögliche Homo- und/oder Heterotetramerbildungen der Kanaluntereinheiten.

Durchgeführt wurde eine molekulare Charakterisierung der Kaliumkanäle auf Protein- und RNA-Ebene in JGZ von Rattennieren. Die Tiere wurden mit einer NaCl-armen Diät behandelt, welche die Zahl von reninpositiven Zellen steigert. Die genaue Lokalisation der Kir-Kanäle (Kir6.1, Kir2.1, Kir2.2) in JGZ der afferenten Arteriole erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten von Rattennieren mit den entsprechenden Kanalprotein-Antikörpern. Bestätigt wurde die Proteinexpression in JGZ und der Niere durch die proteinchemische Methode des Western Blottings. Das Expressionsprofil von Kir2.1-, Kir2.2- und Kir2.3-mRNA in JGZ der Rattenniere wurde mit semiquantitativer RT-PCR untersucht.

2 MATERIAL UND VERSUCHSTIERE

2.1 Chemikalien, Enzyme, Kits

Acrylamid	Merck, Darmstadt
Aceton	Uni-Apotheke, Tübingen
Agarose Ultra Pure	GIBCO/BRL, Karlsruhe
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg v.d.H.
APS	Roth, Karlsruhe
BioRad DC Protein Assay Kit	BioRad, München
BioRad DC Protein Assay Reagenz A	BioRad, München
BioRad DC Protein Assay Reagenz B	BioRad, München
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA Rinderalbumin	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Fluka, Buchs, CH
Coomassie Brilliant Blau R250	AppliChem, Darmstadt
DEPC-Wasser	AppliChem, Darmstadt
DNA Molecular Weight Marker XIV	Roche-Diagnostics, Mannheim
d NTP's	Promega, Madison, WI, USA
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethansäure (Essigsäure)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs, CH
Gelatine	Fluka, Buchs, CH
Glycerol	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Roth, Karlsruhe
GAR-AP Detection Kit	BioRad, München
HCl	Fluka, Buchs, CH

Igepal	Sigma, Taufkirchen
Immersionsöl (ne23 1.518)	Leica, Wetzlar
Immun-Star™ Substrate	BioRad, München
Isopentan	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
KCr(SO ₄) ₂ *12H ₂ O	Fluka, Buchs, CH
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	PeqLab, Erlangen
MOPS	Invitrogen, Groningen, NL
NaCl	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
NDS: Esel Normalserum	DAKO, Glostrup, DK
NGS: Ziegen Normalserum	DAKO, Glostrup, DK
NKS: Kaninchen Normalserum	DAKO, Glostrup, DK
NU-Page™ MOPS SDS Running Buffer (20 x)	Invitrogen, Groningen, NL
NU-Page™ Transfer Puffer (20 x)	Invitrogen, Groningen, NL
Oligo (dT) Primer	Promega, Madison, WI, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PCR-Puffer	PanBiotech, Aidenbach
Peq Gold RNA Pure™	PeqLab, Erlangen
PMSF	Sigma, Taufkirchen
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, Taufkirchen
Rainbow™-Marker	Amersham, Braunschweig
Random Primers	Promega, Madison, WI, USA
Reverse Transkriptase (RT)	PeqLab, Erlangen
RNasin® RNase Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Roti [®] -Load Probenpuffer (4 x konz.)	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Slim Fast	Sun Nutritional, Milton Keynes, UK
Sucrose	Fluka, Buchs, CH
TEMED	Roth, Karlsruhe
Taq Polymerase	PanBiotech, Aidenbach
TissueTek [®]	Sakura, Torrance, CA, USA
Trapanal [®]	BYK Gulden, Konstanz
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Fluka, Buchs, CH

2.2 Puffer und Lösungen

- **HEPES gepufferte Physiologische Salzlösung (HEPES-PS):**

NaCl	140 mM
KCl	2,8 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM
D(+)-Glucose	11 mM

Die Substanzen wurden in 4500 ml A. bidest angesetzt, der pH mit NaOH auf 7,4 eingestellt und mit A. bidest auf 5000 ml aufgefüllt.

- **Paraformaldehyd-Fixierlösung:**

PFA	4 g
Sucrose	3 g

Die Substanzen wurden in 50ml A. bidest unter Zugabe von 2-3 Tropfen 5 N NaOH gelöst und unter Rühren auf 60 °C erwärmt.

Na₂HPO₄*2H₂O 1,068 g

NaH₂PO₄*H₂O 0,828 g

Die Substanzen wurden in 30 ml A. bidest gelöst, zur PFA-Lösung zugegeben, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt und mit A. bidest auf 100 ml aufgefüllt.

- **PBS (phosphatgepufferte Salzlösung):**

5xPBS:

NaCl	685 mM
KCl	13,5 mM
Na ₂ HPO ₄	50 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM

Die Substanzen wurden in 800 ml A. bidest gelöst, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt, mit A. bidest auf 1000 ml aufgefüllt und bei 4 °C aufbewahrt.

1 x PBS: 100 ml 5 x PBS wurden mit 400 ml A. bidest verdünnt.

- **Poly-L-Lysin Stammlösung:**

Die Substanz wurde als Stammlösung (1 mg/1 ml A. bidest.) bei 8 °C aufbewahrt und je nach Bedarf weiter verdünnt.

- **RIPA-Puffer:**

Igepal	1 %
Natriumdeoxycholat	0,5 %
SDS	0,1 %

Die Reagenzien wurden in 1 x PBS gelöst und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

- **Stammlösung (SL): 2,5 % Triton + 10 % DMSO**

DMSO	100µl
Triton X-100	25µl
PBS	875µl

- **TAE-Puffer (50x):**

Tris-Base	242 g,
Essigsäure	57,1 ml,
EDTA, pH 8,0	100 ml (0,5M),

werden mit ddH₂O auf 1 Liter aufgefüllt. Zur Verwendung wird der Puffer 1:50 mit ddH₂O verdünnt.

- **TBE-Puffer (10x):**

Tris-Base	108 g,
Borsäure	55 g,
EDTA, pH8,0	4 ml (0,5M),

werden mit ddH₂O auf 1 Liter aufgefüllt. Zur Verwendung wird der Puffer 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

- **TBS* (für Immunhistologie):**

10 x TBS*:

Tris-HCl 50 mM 12,11 g/2 l

NaCl 150 mM 17,53 g/2 l

Die Substanzen wurden unter Rühren in 1,7 l ddH₂O gelöst, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, mit ddH₂O auf 2 Liter aufgefüllt und bei 4 °C aufbewahrt.

1 x TBS*: 100 ml 10 x TBS* wurden mit 900 ml ddH₂O verdünnt.

- **TBS (für Western Blot) :**

10 x TBS:

Tris-HCl 100 mM 31,52 g/2 l

NaCl 150 mM 17,53 g/2 l

Die Substanzen wurden mit ddH₂O auf 2 Liter aufgefüllt, mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt und bei 4 °C aufbewahrt. Bei Gebrauch wurde 10 x TBS mit 900 ml ddH₂O verdünnt.

- **TE (Tris-EDTA):**

Tris-HCl 10 mM

EDTA 1 mM

Der gewünschte PH-Wert wurde mit HCl eingestellt.

2.3 Geräte und Hilfsmittel

Chemiluminescent Detection Film	Roche-Diagnostics, Mannheim
DNA Mini Sub Cell Gelkammer	BioRad, München
Einkanal-UV-Vis-Spektrometer DU-640	Beckmann, Fullerton, CA, USA
Electrophoresis Unit, „große Kammer“	Hoefer, Heidelberg
ELISA-Reader MR7000	Dynatech, Rückersdorf
Falcon Tubes (10ml und 50ml)	Eppendorf, Hamburg
Filter-Millex-GS	Millipore, Billerica, MA, USA
Folienschweissgerät-Futura	Hintze & Kunick, Berlin
Gel-Dokumentationssystem	BioRad, München
Gelkammer, Midicell®	OWL, Portsmouth, NH, USA
Gradientencycler	Eppendorf, Hamburg
Hamilton-Microliter™ Spritze	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Ch
Hybridisierungsöfen	MWG Biotech, Ebersberg
Kanülen: Sterican 20G x 2 ^{4/5}	Braun, Kronberg
Kryostat (Minotome)	International Equipment Company, Vernon Hills, IL, USA
Laser Scanning Mikroskop	Zeiss LSM 410 Invert, Jena
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mikrotiter-Platte	Greiner, Frickenhausen
Milli-Q-Plus Filteranlage	Millipore, Billerica, MA, USA
Multi-Cycler PTC 100	Biozym, Oldendorf
Nitrozellulose Membran	Invitrogen, Groningen, NL
Nu-Page 10% Tris Gele	Invitrogen, Groningen, NL
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
PVDF-Membran	Amersham, Braunschweig
Rayon-X-Kassette	Eppendorf, Hamburg
Plastikrahmen (Sandwich)	BioRad, München
Sanoklav	Fredegari, Albuziano, Italien
Schwämme	BioRad, München
Thermocycler	MWG Biotech, Ebersberg

Ultraturrax (Stabhomogenisator)	IKA-Labortechnik, Staufen
Ultrazentrifuge L-70	Beckmann, Fullerton, CA, USA
Vortex	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Whatman-Filterpapier	Multimed, Kirchheim/Teck
X-cell sure lock™ Mini-Cell	Invitrogen, Groningen, NL

2.4 Antikörper

Primärantikörper:

Adenosin-A1-Rezeptor-AK: Kaninchen Anti-Ratte IgG	Alpha Diagnostics International, San Antonio, TX, USA
Anti-Tamm–Horsfall-Protein: Ziege IgG	ICN, Eschwege
Anti-vWF: monoklonaler Maus Anti-Mensch IgG	Roche-Diagnostics, Mannheim
β-Actin: monoklonaler Maus Anti-Kaninchen IgG	Sigma, Taufkirchen
Kir6.1-AK: polyklonaler Kaninchen Anti-Ratten IgG	Veh R., Charité, Berlin
Kir2.1-AK: polyklonaler Kaninchen Anti-Ratten Serum	Veh R., Charité, Berlin
Kir2.2-AK: polyklonaler Kaninchen Anti-Ratten IgG	Veh R., Charité, Berlin
Kir2.1 ^a -AK: polyklonaler Kaninchen Anti-Mensch IgG	Alomone, Jerusalem, Israel
Kir2.3 ^a -AK: polyklonaler Kaninchen Anti-Ratten IgG	Alomone, Jerusalem, Israel
Phalloidin–Alexa TM 633 Ziege Anti-Kaninchen IgG	MolecularProbes, Eugene, OR, USA
Renin-AK: polyklonaler Kaninchen Anti-Rattenrenin IgG	Albinus M., Pharma.-Inst., Tübingen
SYTO [®] 59	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
SYTO [®] 62	Molecular Probes, Eugene, OR, USA

Sekundärantikörper:

Alexa TM 488 Ziege Anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Alexa TM 488 Esel Anti-Ziege IgG	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Alexa TM 633 Ziege Anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
AP-konjugierter Ziege Anti-Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg

^a Kir2.x-Antikörper der Firma Alomone in Jerusalem

AP-konjugierter Ziege Anti-Maus IgG	Sigma, Taufkirchen
Cy TM 5 Ziege Anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg
Cy TM 5 Esel Anti-Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg

2.5 Primersequenzen und Primerdesign 5' → 3'

Kir2.1	sense: 5'CAA TGC AGA CTT TGA AAT CG 3' (nt) 864-883 antisense: 5'TCT CTG GAA CTC CGT TCT CA 3' (nt) 1170-1189 (gene accession no. GA L48490); für Sequenz von 326 bp
Kir2.2	sense: 5'GCC GTA CAC CCT GTG TGC TA 3' (nt) 419-438 antisense: 5'ATC CCG GTC TGT AGC CAC CT 3' (nt) 1235-1254 (gene accession no. GA X78461); für Sequenz von 836 bp
Kir2.3*	sense: 5'AAA GCC CGA ATG CCC CCA AA 3' (nt) 407-426 antisense: 5'GCC TCC TCT TTG GAA CCT GC 3' (nt) 1303-1322 (gene accession no. GAS71382); (Bradley et al., 1999); 916 bp
Cyclophilin	sense: 5'GGG GAG AAA GGA TTT GGC TA 3' (nt) 159-178 antisense: 5'ACA TGC TTG CCA TCC AGC C 3' (nt) 397-415 (gene accession no. GA M25637); für Sequenz von 257 bp
β-Actin	sense: 5'AAC CGC GAG AAG ATG ACC CAG ATC ATG TTT 3' (nt) 2383-2402 antisense: 5'AGC AGC CGT GGC CAT CTC TTG CTC GAA GTC 3' (nt) 3071-3091 (gene accession no GA V01217); für Sequenz von 372 bp

* Bradley et al., 1999 designten den Primer Kir2.3* nach der Kir2.3 Sequenz der Maus, da ihnen keine Rattensequenz der Kir2.3 cDNA vorlag. Neuanalysen, die wir mit der mittlerweile vorliegenden Kir2.3 Sequenz der Ratte durchführten, ergaben leider eine schlechte Übereinstimmung mit der in meiner Arbeit benutzten Kir2.3* Primersequenz der Maus. Sämtliche erhaltene Werte und Ergebnisse können somit nicht als direkte Referenzen herangezogen werden.

Die Synthese und der Bezug der Primer erfolgte durch die Firma Interactiva Biotechnologie GmbH in Ulm.

Die Primerauswahl von Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.3* wurde unter der Referenz von Bradley et al., 1999 durchgeführt. Cyclophilin und β -Actin als sogenannte Housekeeping-Gene wurden als Laborstandard verwendet. Beim Primerdesign war darauf zu achten, daß eine Dimer-Bildung der beiden Primer und die Sekundärstrukturbildung innerhalb eines Primers durch Selbstkomplementarität unwahrscheinlich ist. Der GC-Gehalt, der in dieser Arbeit verwendeten Primer, lag bei 40-70 % und war dem GC-Gehalt der zu amplifizierenden Sequenz ähnlich. Jeder Primer wurde Standard-HPLC gereinigt. Die Schmelztemperatur T_m der Primer war jeweils ähnlich und lag zwischen 48-56 °C, für β -Actin zwischen 67-73 °C. Die Länge der Primer lag bei 19-30 bp. Um nur ein einziges, spezifisches DNA-Fragment zu amplifizieren, sollte die Primer-Sequenz in der Probe nicht wiederholt vorhanden sein oder große Ähnlichkeit zu anderen Sequenzen besitzen.

2.6 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Deutschland GmbH) mit einem Körpergewicht von 200-350 g. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 60 % und einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Um die Zahl der reninsezernierenden Zellen zu erhöhen erhielten sie als Futter eine einmalige Furosemidapplikation (10 mg/kg, i.p.; die Applikation wurde von Frau PD Dr. med. M. Albinus, Pharmakologisches Institut durchgeführt) und anschließend eine mindestens 14-tägige NaCl-arme Ernährung. (Altromin C1036: 150 mg/kg Na^+ , 3 mg/kg Cl^-). Dies führt zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl dieser Zellen (Cantin et al., 1977; Bührle et al., 1984; Hackenthal et al., 1987; Wurfer et al., 1988; Rauch, 2000). Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser.

3 METHODEN

3.1 Proteinnachweise

Die in den Lösungsansätzen enthaltenen Angaben in % beziehen sich auf v/v, sonst werden sie bei der betreffenden Lösung mit w/v angegeben. Der Begriff „ddH₂O“ wird im folgenden für A. bidest. verwendet, das über eine Milli-Q-Plus Filteranlage (Millipore) gereinigt wurde. Als „autoklaviert“ bezeichnete Lösungen und Materialien wurden für 20 Minuten bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert (Sanoklav). Als „sterilfiltriert“ bezeichnete Lösungen wurden durch einen 0,22 µm Filter (Millex-GS, Millipore) filtriert.

3.1.1 Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Lokalisation einwärtsgerichteter Kaliumkanäle in reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole der Ratte auf Proteinebene wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten durchgeführt. Die Kryoschnitte wurden aus Nierenschnitten von natriumchloridarm-ernährten Ratten angefertigt, gefärbt und mit dem Laser Scanning Mikroskop ausgewertet.

Weiterhin wurde untersucht in wieweit Kolo-kalisationen der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle mit Markerproteinen verschiedener Tubulusabschnitte der Rattenniere vorlagen. Für die Färbung der Tubuli wurden ebenfalls Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten angefertigt (Pfaff et al., 1999).

Als Positivkontrollen dienten longitudinale Kryoschnitte des Groß- und Kleinhirns derselben Ratte, die analog zu den Nierenschnitten behandelt und gefärbt wurden.

Die Negativkontrollen wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit PBS anstatt dem Primärantikörper, inkubiert (siehe 3.1.1.3.1). Die Spezifität des jeweiligen Antikörpers wurde im Westernblot überprüft.

3.1.1.1 Organentnahme von Niere und Gehirn

Zum Erstellen von Kryoschnitten wurden die zu untersuchenden Organe einer natriumchloridarm-ernährten Ratte entnommen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und zu gebrauchsfertigen Kryoschnitten weiterverarbeitet. Die Organentnahme erfolgte nach zwei Protokollen. Nach Pfaff et al., 1999 wurden die Organe vor und nach der Entnahme aus dem Situs mit Paraformaldehyd-Lösung fixiert (3.1.1.1.1) und als „perfusionsfixierte Organe“ weiterverarbeitet. Die zweite Präparation wurde nach Kloor et al., 2000 (3.1.1.1.2) durchgeführt. Bei dieser Methode erfolgte eine unbehandelte, native Entnahme der Organe, die auch in weiteren Arbeitsschritten nicht fixiert wurden.

3.1.1.1.1 Entnahme von perfusionsfixierten Organen

- Die Narkose einer Ratte erfolgte mit Trapanal[®] (Thiopental-Natrium: 90 mg/kg; i.p.). 500 mg Thiopental-Natrium wurden in 20 ml A. bidest. gelöst und als 1 ml Aliquot bei –20 °C aufbewahrt.
- Bei negativem Reflexstatus (nach 10-15 min) wurde mit der Präparation begonnen.
- Der auf dem Rücken liegenden Ratte wurde abdominal ein V-Schnitt mit Öffnung nach kaudal gesetzt und der Situs durch parallele Schnittführung entlang der Medianlinie bis zu den Rippenbögen erweitert.
- Das Diaphragma wurde eröffnet, die Rippen durchtrennt und nach oben geklappt.
- Mit der linken Hand wurde das Herz gegriffen, die linke Ventrikelspitze abgeschnitten und ein PE-Schlauch (2 mm o.d., 1 mm i.d.) in die Aorta eingeführt, bis er mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand gut zu greifen war. Danach wurde das rechte Atrium mit einem Schnitt eröffnet.
- Die Perfussion erfolgte mit 50 ml PBS und anschließend mit 90-100 ml Paraformaldehyd-Fixierlösung (PFA)

- Dann wurden die Nieren entnommen, die Nierenkapsel entfernt und als Nierenhälften für 60 min bei 8 °C in PFA-Lösung nachfixiert.
- Der Schädel wurde mit einem Schnitt von nuchal nach frontal entlang der Sutura sagittalis eröffnet. Die Schädelkalotte wurde aufgeklappt, Groß- und Kleinhirn entnommen, geviertelt und entsprechend den Nierenhälften nachfixiert.
- Die Gewebestücke wurden in PBS gewaschen und 60 min bei 8 °C in PBS inkubiert.
- Schließlich inkubierte man sie zur Dehydratation über Nacht (12 h) bei 8°C in einer 30 % igen Sucroslösung (w/v in PBS).
- Am nächsten Tag wurde jeweils eine Nierenhälfte bzw. ein Gehirnstück mit der Schnittfläche nach unten in ein vorgefertigtes Töpfchen aus Alufolie gelegt.
- Das Töpfchen wurde in ein mit Isobutan gefülltes Alugefäß gehalten, welches in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, bis die Organe komplett durchgefroren waren. Die fixierten Organpräparate konnten bei -80 °C aufbewahrt werden.

3.1.1.1.2 Entnahme von nicht perfusionsfixierten Organen

- Tötung der Ratten durch Genickbruch mit Dekapitation.
- Anschließende Präparation von dorso-lateral durch Schnittführung unterhalb des letzten Rippenbogens nach kaudal und Aufsuchen der Nierenlager.
- Die Nieren wurden freipräpariert, entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.
- Der Schädel wurde von nuchal mit einem Schnitt entlang der Sagittalnaht Richtung Gesicht eröffnet, Groß- und Kleinhirn entnommen und in Stickstoff tiefgefroren.
- Die Organpräparate wurden dann zu Kryoschnitten aus nicht perfusionsfixierten Organen weiterverarbeitet oder längerfristig bei -80 °C aufbewahrt

Sollte für die RNA-Isolierung und für den Westernblot weiteres Organmaterial akquiriert werden, konnte dies im Rahmen der gleichen Operation auf die oben beschriebene Art und Weise geschehen.

3.1.1.2 Anfertigung von Kryoschnitten

Die Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte entsprechend der Organentnahme mit perfusionsfixierten Organen (siehe 3.1.1.1.1) und mit nicht perfusionsfixierten Organen (siehe 3.1.1.1.2):

- Zum Anfertigen der Schnitte wurden die Nierenhälften und Gehirngewebsstücke mit Tissue-Tek[®] auf eine Halterung des vorgekühlten Kryostaten „geklebt“ und Schnitte mit der gewünschten Dicke (20–25 µm) angefertigt.
- Es wurden immer zwei Schnitte auf einen mit Gelatine (2,5 g Gelatine wurden mit 0,25 g $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in 500 ml A. bidest. gelöst, die Objektträger vollständig in diese Lösung eingetaucht und luftgetrocknet) beschichteten Objektträger (76 x 26 mm, Menzel) aufgebracht.
- Die Schnitte mit perfusionsfixierten Organen wurden für 10-15 min bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.
- Die Schnitte mit nicht perfusionsfixierten Organen wurden 1 h bei Raumtemperatur getrocknet, 10 min mit Aceton fixiert, erneut 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und sofort gefärbt oder bei -80 °C aufbewahrt.

3.1.1.3 Färbungen von Kryoschnitten

Zur Immunfärbung wurde ein Primärantikörper benötigt, der spezifisch gegen das Antigen gerichtet ist, und einen Sekundärantikörper, der gegen die Spezies, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde, gerichtet ist. Der Sekundärantikörper wurde im Überschuß zugegeben, womit sichergestellt wurde, daß möglichst alle Bindungsstellen (= Primärantikörper) besetzt werden und ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis entstand. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde weiterhin durch Verwendung eines Normalserums verbessert, das aus der gleichen Spezies stammte, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde. Die Wirkung des Normalserums beruhte auf der Bindung an unspezifische Bindungsstellen, die somit dem Sekundärantikörper nicht mehr zugänglich waren.

Als Primärantikörper zur Lokalisation der spezifischen Kaliumkanäle im Bereich der afferenten Arteriole der Rattenniere wurden Antikörper aus Kaninchen (Kaninchen-Anti-Ratte IgG) benutzt: Kir2.1-AK, Kir2.2-AK, Kir6.1-AK. Diese wurden uns freundlicherweise von Professor Dr. med. Rüdiger W. Veh (Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, Charité) zur Verfügung gestellt und wurden entsprechend für Kv Untereinheiten charakterisiert (Veh et al., 1995). Für die Herstellung der AK's wurden jeweils die spezifischen Ratten-Sequenzen und die C-terminalen ca. 50 Aminosäuren als Fusionsprotein mit GST zum Immunisieren verwendet. Die Antikörper sind durch Entfernung kreuzreagierender anti-Kirs monospezifisch und affinitätsgereinigt (Kir6.1 und Kir2.2) oder als Serum vorliegend (Kir2.1). Als Ausgangskonzentrationen dienten die angegebenen Arbeitsverdünnungen für die Antikörper, die sich auf das ABC-Elite-Protokoll nach Professor Dr. Veh beziehen.

Der Nachweis des Primärantikörpers im Präparat erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper aus der Ziege (Alexa 488, Ziege Anti-Kaninchen IgG), dessen Absorptionsmaximum bei 488 nm und Emissionsmaximum bei 590 nm (grün) liegt. Dieser Farbstoff wurde durch einen Argon-Laser angeregt und mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops detektiert.

Um die Orientierung im Kryoschnitt zu erleichtern, wurde zeitgleich zur oben geschilderten Färbung eine Doppelfärbung durchgeführt, welche spezifisch gegen Endothelzellen gerichtet war. Hierzu wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen den „von Willebrand Faktor“ (= Faktor VIII, antihämophiles Globulin A), benutzt (Kreisberg et al., 1978). Gegen diesen Primärantikörper wurde ein fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper aus der Ziege benutzt (Cy5, Ziege Anti-Maus IgG), dessen Absorptionsmaximum bei 651 nm und dessen Emissionsmaximum bei 674 nm (rot) liegt. Dieser Farbstoff wurde mit einem Helium-Neon-Laser angeregt und mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop detektiert.

Die Färbung der Kryoschnitte erfolgte in einer feuchten Kammer, wobei es sich um eine Metallbox handelte, welche mit Kleenex-Tüchern ausgelegt war, die mit A. bidest. angefeuchtet wurden. In der Kammer befanden sich zusätzlich zwei Kunststoffeinsätze, auf die die Objektträger gelegt werden konnten. Die Kammer wurde mit einem Metalldeckel abgedeckt.

3.1.1.3.1 Doppelfärbung mit Kanal-AK und vWF-AK

Antikörperverdünnungen:

- **Lösungen mit AK 1 (Primärantikörper): jeweilige Endkonzentrationen der AKs**

	A1-Rezeptor-AK (1:100)	Kir6.1/ Kir2.1-AK (1:50)	Kir 2.2-AK (1:25)
AK 1	5 µl	10 µl	20 µl
Anti-vWF(1:100)	5 µl	5 µl	5 µl
Triton + DMSO (SL)	50 µl	50 µl	50 µl
NGS	25 µl	25 µl	25 µl
PBS	415 µl	410 µl	400 µl

- **Negativkontrolle:**

Triton + DMSO (SL)	50 µl
NGS	25 µl
NKS	5 µl
PBS	420 µl

- **Lösungen mit AK 2 (Sekundärantikörper):**

AlexaTM488 Ziege Anti-Kaninchen IgG und CyTM5 Ziege Anti-Maus IgG wurden jeweils 1:1 mit Glycerol gemischt und als 10 bzw. 5 µl Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

Alexa TM 488 Ziege Anti-Kaninchen (1:75)	10 µl
Cy TM 5 Ziege Anti-Maus (1:150)	5 µl
Triton - DMSO (SL)	75 µl
PBS	660 µl

Die Doppelfärbung der Kryoschnitte wurde wie beschrieben durchgeführt, wobei Abweichungen der Färbung der nicht perfusionsfixierten Schnitte in Klammern beschrieben werden:

- Die Objektträger wurden 15-30 min bei Raumtemperatur aufgetaut, mit einem Kleenex-Tuch vorsichtig abgetupft und die Nierenkonturen mit einem speziellen Fettstift für die Immunhistochemie, „DAKO-Pen“, umrandet.
- Anschließend wurden die Schnitte 10 min mit PBS (TBS*) gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellmembran 3 x 10 min mit PBS + 0,25 % Triton X-100 + 1 % DMSO (3 x 10 min mit TBS*) inkubiert.
- Danach erfolgte eine Inkubation für 60 min mit PBS + 5 % NGS + 0,25 % Triton X-100 + 1 % DMSO (TBS* + 5 % NGS + 1 % BSA+ 2,5 % Sucrose).
- Die Präparate wurden über Nacht (12 h) mit AK 1 (Kontrolle mit NKS) in PBS + 5 % NGS + 0,25 % Triton X-100 + 1 % DMSO bei 8 °C (TBS* + 5 % NGS + 1 % BSA+ 2,5 % Sucrose bei Raumtemperatur) inkubiert.
- Am nächsten Tag wurden sie 3 x 10 min mit PBS + 0,25 % Triton X-100 + 1 % DMSO (3 x 15 min mit TBS*) gewaschen und 90 min mit AK 2-Lösung (60 min mit AK 2 in TBS* + 5 % NGS + 1 % BSA+ 2,5 % Sucrose) bei Raumtemperatur inkubiert.
- Anschließend wurde 3 x 10 min mit PBS + 0,25 % Triton X-100 + 1 % DMSO (3 x 15 min mit TBS*) gewaschen.
- Die Schnitte wurden mit zwei Tropfen FluorSave™ Reagent eingedeckt und mit einem Deckglas (16 x 32 mm, Menzel) versehen. Nachdem das Eindeckmedium getrocknet war, wurden die Präparate bis zur Auswertung bei 8 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.1.1.3.2 Doppelfärbung mit Kanal-AK und dem Marker des proximalen Tubulus

Um die Aktinfilamente in den Podozytenfußfortsätzen und im Bürstensaum des proximalen Tubulus der Rattenniere zu identifizieren, wurde Rhodamin-konjugiertes Phalloidin (Phalloidin–Alexa™633Ziege Anti-Kaninchen IgG) verwendet und mit dem zu untersuchenden Kir-AK: Kaninchen Anti-Ratten IgG auf Kollokalisierung untersucht.

Die ersten Arbeitsschritte der Färbung erfolgten entsprechend der Doppelfärbung der Kryoschnitte (3.1.1.3.1). Als Primärantikörper wurde der zu untersuchende Kir-AK (in gleicher Konzentration) ohne Anti-VWF verwendet und mit dem Sekundärantikörper Alexa 488, Ziege Anti-Kaninchen IgG gekoppelt. Nach der Inkubation der Präparate für 90 Minuten mit AK 2 in PBS + 0.25 % Triton X-100 + 1 % DMSO, wurde die Färbung um folgende Arbeitsschritte erweitert:

- Die Schnitte wurden 15 min mit PBS + 0.25 % Triton X-100 + 1 % DMSO gewaschen und anschließend 20 min mit Phalloidin–Alexa™633 (5 µl in 200 µl PBS) inkubiert.
- Nach erneutem Waschen in PBS für 15 min wurden die Schnitte mit FluorSave™ Reagent eingedeckt, einem Deckglas versehen und bis zur Auswertung bei 8 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.1.1.3.3 Doppelfärbung mit Kanal-AK und dem Marker des dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife

Der dicke aufsteigende Ast der Henle Schleife (TALH) wurde mit einem polyklonalen Antikörper (Anti-Tamm–Horsfall-Protein: Ziege IgG) markiert, der sich spezifisch gegen das Tamm-Horsfall Protein richtet (Hoyer et al., 1979). Das Tamm-Horsfall Protein ist ein Markerprotein, das sich in der luminalen Membran des TALH befindet. Als Sekundärantikörper gegen das Anti-Tamm–Horsfall-Protein wurde Alexa™488 Esel Anti-Ziege IgG verwendet.

- Die ersten Arbeitsschritte erfolgten entsprechend der Doppelfärbung der Kryoschnitte (3.1.1.3.1). Aufgrund der unterschiedlichen Spezies wurde anstatt mit NGS (Ziegen-Normal-Serum) mit NDS (Esel-Normal-Serum) präinkubiert. Als Primärantikörper wurde eine Einfachfärbung mit den Kir-AK (Konzentration beibehalten) durchgeführt. Als Sekundärantikörper wurde Cy™5 Esel Anti-Kaninchen IgG (1:100; 5 µl in 445 µl PBS + 50 µl Stammlösung) verwendet. Die Sekundärantikörper Alexa™488 Esel Anti-Ziege IgG und Cy™5 Esel Anti-Kaninchen IgG wurden jeweils 1:1 mit Glycerol gemischt und als 10 µl bzw. 5 µl Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Nach der Inkubationszeit des AK 2 (Protokoll siehe 3.1.1.3.1) erfolgten weitere Arbeitsschritte:
- Die Schnitte wurden 15 min mit PBS gewaschen und für 1,5 h mit 2 µl Anti-Tamm–Horsfall-Protein (1:100) in 188 µl PBS und 10 µl Stammlösung bei Raumtemperatur inkubiert.
- Danach wurden sie für 15 min in PBS gewaschen.
- Die anschließende Inkubation der Präparate erfolgte für 90 min mit Alexa™488 Esel Anti-Ziege IgG (1:300) 1 µl in 294 µl PBS und 5 µl Stammlösung bei Raumtemperatur.
- Sie wurden erneut für 3 x 10 min in PBS gewaschen.
- Als letzten Schritt wurden sie mit FluorSave™ Reagent eingedeckt, einem Deckglas versehen und bis zur Auswertung bei 8 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.1.1.4 Färbungen von isolierten JGZ der Ratte

Weiterhin wurde die Methode der Immunfluoreszenz auch an frisch isolierten reninsezernierenden juxtaglomerulären Zellen (JGZ) von NaCl-arm ernährten Ratten angewandt. Die Isolierung der Zellen erfolgte wie bei Sosath, 1999 beschrieben und wurde von Frau PD Dr. med. M. Albinus, Pharmakologisches Institut, Tübingen (Albinus et al., 1998) durchgeführt. Zum Aufbringen der isolierten Zellen wurden Objektträger mit 99,9 % Alkohol, anschließend mit A. bidest. gespült und mit einem Kleenex-Tuch getrocknet. Dann wurden die Objektträger mit 100 µl einer mit A. bidest. 1:5 verdünnten Poly-L-Lysin Stammlösung beschichtet und luftgetrocknet.

Desweiteren erfolgte eine parallele Färbung an HEK-Zellen 293, die von Frau Dr. Annette Hambrock kultiviert (Hambrock et al., 1999) und freundlicherweise bereitgestellt wurden.

Die Färbung der Zellen wurde bei Raumtemperatur nach folgendem Schema durchgeführt:

- 40 µl Zellsuspension (ca. 4500 Zellen) wurden bei Raumtemperatur auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger aufgetropft und mit 200 µl PBS verdünnt.
- Zum Absetzen der Zellen folgte eine 15 min Wartezeit.
- Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgegossen und die Zellen mit dem DAKO-Fettstift umrandet.
- Danach wurden die Zellen 30 min mit 3,7 % PFA (v/v) + 3 % Sucrose (w/v) in PBS inkubiert und für 10 min mit PBS gewaschen.
- Die Nachfixierung erfolgte für 10 min mit 1 % PFA in PBS.
- Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Präparate für 10 min mit 0,5 % Saponin in PBS gewaschen und für 60 min mit 5 % NGS in PBS präinkubiert.
- Die Inkubation mit Adenosin-A1-Rezeptor-AK (1:100) bzw. NGS (Negativkontrolle) in PBS + 5 % NGS erfolgte über Nacht (12 h) bei 8 °C.

- Am nächsten Tag wurden sie 3 x 10 min mit PBS gewaschen und mit dem AK 2, AlexaTM488 Ziege Anti-Kaninchen IgG (1:100) in PBS für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Erneutes 3 x 10 min Waschen mit PBS.
- Die Präparate wurden für 10 min mit 5 μ M SYTO 62 in PBS inkubiert (Nukleinsäurefarbstoff Syto[®]62: 50 μ l Syto[®]62 wurden in 49,95 ml PBS verdünnt und in Form von 1 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahrt).
- Abschließend wurden die Präparate für 10 min mit PBS gewaschen, mit zwei Tropfen FluorSaveTM Reagent eingedeckt und einem Deckglas versehen. Nachdem das Eindeckmedium getrocknet war, wurden die Präparate bis zur Auswertung bei 8 °C aufbewahrt.

3.1.2 Western Blot

Als weiterer Proteinnachweis der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle in der Ratteniere wurde die Methode des Western Blottings angewandt. Der Western Blot dient wie die Immunfluoreszenzfärbungen der Identifizierung von Polypeptiden auf Proteinebene, ist aber als Methode zur Proteindetektion deutlich sensitiver und spezifischer. Die Proteine werden aus Nieren- und Gehirngewebe (Positivkontrolle) der Ratte extrahiert und ihrer Größe nach auf einem Elektrophoresegel fraktioniert. Nach der Fraktionierung erfolgt der Transfer („Blotten“) auf eine Membran und die Behandlung mit spezifischen Antikörpern zum Nachweis der Proteine.

Die Durchführung des Western Blots erfolgte nach zwei Protokollen. Im ersten Protokoll wurde mit einer „großen Kammer“ (Electrophoresis Unit) und speziellen Puffer und Lösungen gearbeitet. Nach dem zweiten Protokoll wurde eine „Mikrokammer“ (X-cell sure lock™ Mini-Cell) und dafür angefertigte Fertigele, spezielle Puffer und Lösungen verwendet.

Das Vorgehen ist im folgenden beschrieben.

3.1.2.1 Isolierung von Proteinen

Die Methode zur Proteinisolierung sollte so gewählt werden, daß es gelingt, das zu detektierende Antigen möglichst vollständig zu solubilisieren, ohne seine Immunreaktivität zu beeinflussen. Viele Methoden zur Solubilisierung setzen intrazelluläre Proteasen frei, die zur Degradation des Antigens führen können. Je nach Empfindlichkeit des Antigens und der gewebespezifischen Konzentration an extra- und intrazellulären Proteasen wird deshalb der Zusatz von Proteaseinhibitoren notwendig.

Lösung:**• PMSF-Stammlösung (100 mM):**

17,5 mg PMSF wurden in 1 ml Isopropanol gelöst und als Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Bei der Verwendung von dem Proteaseinhibitor PMSF sollte beachtet werden, daß er in wässriger Lösung innerhalb von 30 bis 60 min inaktiviert wird.

Die Isolierung wurde entsprechend folgendem Protokoll (Santa Cruz Biotechnology) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt:

- Alle benötigten Reagenzgefäße und der Lyse-Puffer (RIPA) wurden auf Eis vorgekühlt.
- Das gefrorene Gewebe (3.1.1.1.3) wurde mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten und gewogen.
- Pro 500 mg Gewebe wurden 1,5 ml eisgekühlter Lyse-Puffer (RIPA) und 20 μl Protease Inhibitor Cocktail hinzugefügt. Das Gemisch wurde auf Eis gestellt und mit dem Ultraturrax homogenisiert.
- Anschließend wurde dem Homogenisat 15 μl der 10 mg/ml PMSF-Stammlösung pro 500 g Gewebe dazugegeben, das Ganze gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert.
- Das Lysat wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $10000 \times g$ für 10 min zentrifugiert.
- Der klare Überstand wurde abgenommen und nochmals zentrifugiert. Das im Überstand erhaltene Zell-Lysat wurde in vorgekühlten Reagenzgefäßen aliquotiert und für späteren Gebrauch bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay

Der Bradford Assay ist eine häufig eingesetzte, verlässliche Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Zellysate. Sie beruht auf der Quantifizierung der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau an

das in der Probe enthaltene Protein. Die Farbstoffbindung von Proteinstandard Proben mit bekanntem Proteingehalt werden mit der Farbstoffbindung einer Probe von unbekanntem Proteingehalt verglichen.

Reagenzien und Lösungen:

- **Bradford-Reagenz mit Coomassie Brilliant Blau:**

- **Bio RAD DC Protein Assay (Kit):**

- Reagenz A

- Reagenz B

- **Proteinstandard Proben:**

- BSA gelöst in RIPA-Puffer (siehe 2.2):

- 2 µg/µl; 1 µg/µl; 0,5 µg/µl; 0,25 µg/µl; 0,1251 µg/µl

- **Blank (0-Wert):**

- RIPA-Puffer (siehe 2.2)

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bio RAD DC Protein Assay (Kit):

Von jeder Probe wurden mindestens drei verschiedene Verdünnungen in RIPA-Puffer hergestellt sowie eine Verdünnungsreihe mit BSA als Proteinstandard Proben angelegt. Für den Testansatz wurden je 10 µl der entsprechend verdünnten Probe, 10 µl Proteinstandard (BSA) und 10 µl Blank (RIPA) in Doppelwerten auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 25 µl Reagenz A sowie 200 µl Reagenz B versehen. Nach 15 min wurde die Platte im ELISA-Reader bei 620 nm vermessen. Die Software (Methode DC Protein) des Geräts erstellte eine Eichgerade, in der die Konzentration der Standard-Proben gegen ihre optische Dichte aufgetragen war. Anhand dieser Eichgeraden war es nun möglich, über die optische Dichte der Zellysate ihre Konzentration auszurechnen und somit die eingesetzten Proteinmengen der verschiedenen Gewebeproben im Western Blot einander anzugleichen.

3.1.2.3 SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Fraktionierung der Proteine (Proben) nach ihrem molekularen Gewicht.

3.1.2.3.1 Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese

Die Proben für die Gelelektrophorese wurden in Anwesenheit des stark anionischen Detergenz SDS und des reduzierenden Agens β -Mercaptoethanol durch Erhitzen denaturiert. Durch Gabe von β -Mercaptoethanol wurden Disulfidbrücken reduziert, die als echte kovalente Bindungen die wichtigsten Hauptvalenzen der Seitenketten der Aminosäuren darstellen. Mit der Spaltung wurde das Protein in seine Primärstruktur überführt und erhielt so seine Lauffähigkeit im Gel. SDS, welches nichtkovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstören soll, konnte sich an die denaturierten Polypeptide binden, die dadurch eine negative Ladung erhielten. Die Menge an gebundenem SDS ist dem Molekulargewicht des Polypeptids proportional und unabhängig von der Aminosäuresequenz, was dazu führt, daß die SDS beladenen Polypeptide im Polyacrylamid-Gel auf ihrem Weg zur Anode nach der Größe getrennt werden.

Probenpuffer (reduzierend):

- **2 x RSB-Puffer :**

Tris-HCl (0,125 M), pH 6,8	12,5 ml
SDS (8 %)	8 g
Glyzerin (20 %)	20 ml
Bromphenolblau (1 %)	2 mg

Die Substanzen wurden in 67,5 ml ddH₂O gelöst und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zum Gebrauch wurde dem Puffer 1 ml β -Mercaptoethanol (10 %) zugegeben.

- **Molekulargewichtsstandard:**

Eichproteine für die Gelelektrophorese, Rainbow Marker, 10 µg/µl

Probenvorbereitung:**Große Kammer:**

Die Proben (10 µg, 20 µg, 50 µg Proteinmenge) wurden auf Eis mit RIPA-Puffer verdünnt und mit 2 x RSB-Puffer auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die 100 µl Proben 5 min bei 95 °C denaturiert und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gekühlt.

Mikrokammer:

Die Proben (7,8 µg, 15,6 µg, 78 µg Proteinmenge) wurden mit RIPA-Puffer verdünnt. Anschließend wurden 13 µl der verdünnten Proteinlösung mit 7 µl Roti[®]-Load Probenpuffer versehen, 3 min bei 95 °C denaturiert und bis zum Gelauftrag auf Eis gestellt.

Sämtliche Arbeiten erfolgten unter dem Abzug.

3.1.2.3.2 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese in der großen Kammer wurde mit einem diskontinuierlichen Puffer-System durchgeführt. Das Sammelgel enthielt Tris-HCl (pH 6,8), das Trenngel Tris-HCl (pH 8,8) und der Laufpuffer Tris-Glycin (pH 8,3). Alle Komponenten des Systems enthielten 0,4 % SDS (Laemmli, 1970). Die SDS-Polypeptid-Komplexe konzentrierten sich nach dem Auftragen und der Wanderung durch das Sammelgel in einer schmalen Zone an der Grenzlinie zum Trenngel. Das Sammeln der Proben vor Einlaufen in das Trenngel erhöhte die Auflösung der SDS-PAGE erheblich.

Das Polyacrylamid-Gel bestand aus polymerisiertem Acrylamid, das durch das bifunktionale Agens Bisacrylamid quervernetzt war. Sowohl die Prozentigkeit des Polyacrylamid-Gels als auch der Grad der Quervernetzung der Polymers waren für die Auflösung entscheidend:

Tabelle 2.6 Auflösung von Polyacrylamid-Gelen zur Auftrennung von Proteinen

Acrylamid (%) ^a	Auflösung des Gels für Polypeptide (kD)
5,0	57 bis 212
7,5	36 bis 94
10	16 bis 68
15	12 bis 43

^aAcrylamid/ Bisacrylamid = 37,5:1

Aufgrund der Molekulargröße der zu untersuchenden Proteine Kir6.1 (50 kD), Kir2.1 (48 kD), Kir2.2 (49 kD) und Kir2.3 (49,5 kD) und β -Actin (46 kD) wurde in meiner Arbeit ein 12,5 % Polyacrylamid-Gel für die große Kammer und ein 10 % Fertiggel für die Mikrokammer gewählt (Arbeitsanleitung nach Harsch, S.).

Lösungen und Puffer:

Große Kammer:

- **APS (10 %):**

1 g APS wurde in 10ml ddH₂O gelöst, dem Gel hinzugegeben und nach Zugabe von TEMED sofort gegossen. (Bei Herstellung ab einer 15 % Lösung mußte auf sehr schnelles Gießen geachtet werden.)

- **4 x Lower Tris:** 1,5 M Tris Base und 1,5 M Tris-Cl

Die Substanzen wurden zusammengegeben, auf einen pH von 8,8 eingestellt und 0,4 % SDS hinzugefügt.

- **4 x Upper Tris:** 0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 6,8

- **Laufpuffer, 10 x Laemmli, pH 8,3:**

Tris Base (25 mM) 60,6 g

Glycin (250 mM) 283 g

SDS 20 g

Die Lösung wurde mit ddH₂O auf 2 l aufgefüllt auf pH 8,3 eingestellt.

Zum Gebrauch: 100 ml 10 x Laemmli wurden mit 900 ml ddH₂O verdünnt.

Mikrokammer:• **Laufpuffer, 1 x MOPS (300 ml) :**

NU-Page™ MOPS SDS Running Buffer (20 x)	15 ml
DEPC-Wasser	285 ml

Gießen des Gels für die große Kammer:

Die Glasplatten, zwischen die die Acrylamid-Lösung gegossen wird, wurden gründlich mit Wasser und Seife gereinigt, mit 70 % Ethanol gespült, getrocknet und aufeinandergelegt. 1 mm dicke Spacer sorgten für einen schmalen Zwischenraum, der an drei Seiten von einer Silikonabdichtung und mit Agarose 1 % abgedichtet wurde. Die Gießvorrichtung wurde in vertikale Position gebracht, wobei der untere Rand der Glasplatten bündig mit der Auflage abschließen sollte. Unter vorsichtigem Rühren wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge gemischt:

Trenngel:	12,5 % Gel
Acrylamid-Stammlösung	12,8 ml
4 x Lower Tris	7,8 ml
ddH ₂ O	10,5 ml
10 % APS	500 µl
TEMED	50 µl

Sobald TEMED zugefügt wurde, begann die Polymerisation. Die Trenngel-Lösung wurde in den Spalt zwischen den Glasplatten gegossen, wobei am oberen Rand genügend Platz für ein Sammelgel (ca. 3 cm) gelassen wurde. Danach wurde die Gelfront mit Ethanol überdeckt, um zu verhindern, daß O₂ in das Gel diffundiert und die Polymerisation beeinträchtigt. Nach 30 min. war das Gel auspolymerisiert. Ethanol wurde abgegossen und der obere Rand des Gels mit ddH₂O gespült. Mit Hilfe eines Filterpapiers wurde verbliebenes Wasser abgesaugt. Unter vorsichtigem Rühren wurde nun die Sammelgel-Lösung hergestellt, wobei die angegebene Reihenfolge eingehalten wurde:

Sammelgel:	12,5 % Gel
Acrylamid-Stammlösung	2,62 ml
4 x Upper Tris	3,75 ml
ddH ₂ O	8,63 ml
10 % APS	250 µl
TEMED	25 µl

Die Sammelgel-Lösung wurde, möglichst ohne Bildung von Luftblasen, auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Zur Formung der Geltaschen wurde der Kamm eingesetzt und nach Auspolymerisation (20-30 min) des Gels der Kamm und die Silikonabdichtung entfernt. Das fertige Polyacrylamid-Gel konnte sofort verwendet oder in Plastikfolie gewickelt 2 Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

Gel für die Mikroammer:

Für die Mikroammer wurden NU-Page 10 % Bis-Tris-Gele verwendet. Diese lagerten gebrauchsfertig in einer Pufferlösung (von Invitrogen) bei 4 °C und wurden kurz vor Gebrauch geöffnet.

Gel-Lauf:

Das gebrauchsfertige Gel wurde anschließend in die Apparatur gekammert. In die obere und untere Pufferkammer wurden Laufpuffer (1 x Laemmli/1 x MOPS) gefüllt und die Geltaschen durch Spülen mit einer Hamilton-Spritze von Polyacrylamid-Resten gereinigt. Bei Dichtigkeit der Kammer wurden anschließend die Proben (je 100 µl-große Kammer/je 20 µl-Mikroammer) kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Jeweils 10 µl Rainbow Marker wurde zur Größenorientierung mit auf jedes Gel aufgetragen. Der Marker lief mit den Proben im Gel mit, wobei er sich in mehrere Farbbanden aufspaltete, die mit definierten Proteingrößen übereinstimmen. Luftblasen wurden mit Hilfe einer Spritze entfernt. Der Gellauf der großen Kammer fand bei 4 °C und einer konstanten Spannung von 65 V über Nacht statt, bei der Mikroammer betrug die Laufzeit 50 min bei 200 V und 120 mA. Nach Ende des Gellaufs wurde das Gel aus der Kammer genommen und die obere Glasplatte vorsichtig abgehoben.

3.1.2.4 Blotten-Transfer

Zur weiteren Bearbeitung mussten die Proteine auf eine Membran übertragen werden. Dieses Verfahren wird als Blotten oder Transfer bezeichnet. Um das Kontaminierungsrisiko zu senken, wurden die Membranen nur mit der Pinzette behandelt. Es wurden PVDF-Membranen und Nitrozellulose-Membranen verwendet. Die PVDF-Membran zeigte eine hohe mechanische Stabilität, hohe Proteinbindungskapazität und häufige Wiederverwendbarkeit. Sie wurde hauptsächlich in der großen Kammer eingesetzt. Dagegen eignete sich die Nitrozellulose-Membran v.a. für Anwendungen in der Mikroammer. Sie reagierte jedoch auf mechanische Einflüsse empfindlich.

Vor dem Äquilibrieren der jeweiligen Membran in Transferpuffer wird die Nitrozellulose-Membran kurz in ddH₂O angefeuchtet, während die PVDF-Membran kurz in Methanol gelegt und anschließend gründlich in ddH₂O gespült wird.

Lösungen und Puffer:

Große Kammer:

- **Transferpuffer:**

Tris Base 12,17 g

Glycin 57,1 g

Methanol 800 ml

wurden mit ddH₂O auf 4 l aufgefüllt und der pH-Wert auf 8,3 eingestellt. Der Puffer konnte bei 4 °C bis zu 5 x wiederverwendet werden.

Mikroammer:

- **Transferpuffer:**

NU-Page™ Transfer Puffer (20 x),

50 ml des Fertigpuffers (Zusammensetzung siehe Fa. Invitrogen) wurden zur Verwendung mit 950 ml ddH₂O aufgefüllt. Bis zur Wiederverwendung (max. 5 x) wurde der 1 x Transferpuffer bei 4 °C aufbewahrt.

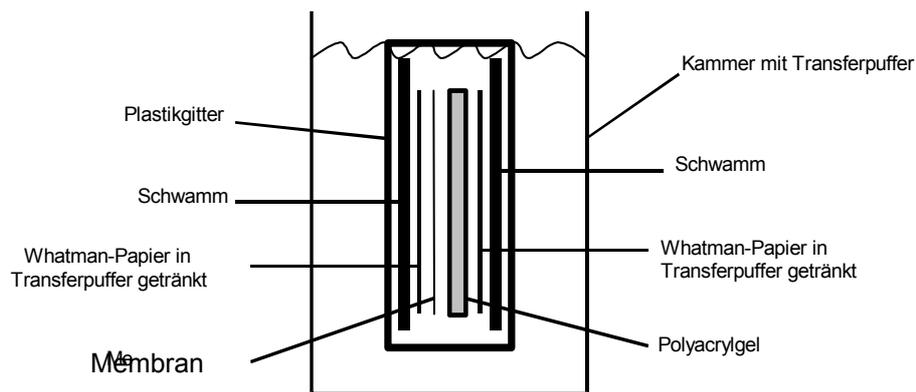


Abb. 3.1: Aufbau des Western Blots zum Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf einer Membran.

Transfer:

- Das Proteingel (große Kammer) wurde von der Glasplatte abgenommen und nach kurzen Waschen in ddH₂O in Transferpuffer 30 min äquiliert.
- Währenddessen wurde die Membran in entsprechender Gelgröße zugeschnitten, 10-30 s in Methanol aktiviert (nur PVDF-Membran), in ddH₂O nachgespült und in Transferpuffer 30 min äquiliert. Zwei Blatt Whatman-Filterpapier wurden in gleicher Größe zugeschnitten und mit zwei Schwämmen in Transferpuffer angefeuchtet (Membranaktivierung und Blotkammervorbereitung erfolgte für beide Kammern mit ihren Puffern gleich).
- Desweiteren wurde Transferpuffer in die Elektro-Blotkammer gegossen und mit Hilfe einer Durchflußkühlung auf 4 °C temperiert.
- Bei der Mikrokommer wurde das Fertiggel vorsichtig mit Pinzette und Skalpell von der Trägerplatte gelöst und auf die Blotkammer gelegt.
- Der Blot-Stapel wurde wie folgt zusammengebaut: auf einen Schwamm wurde ein angefeuchtetes Filterpapier, darauf das Gel, die Membran und das zweite Filterpapier gelegt. Der zweite Schwamm bildete den Abschluß.
- Mit einer Glaspipette wurden alle Luftblasen aus dem Stapel entfernt (Luftblasen zwischen Gel und Membran verhindern den Proteintransfer).
- Der vollständige Stapel wurde in einem Plastikrahmen (Trans-Blot Cell Assembly) fixiert und aufrecht mit der Membranseite des Stapels zur Anode sowie der Gelseite zur Kathode in eine Blotkammer gesteckt.

- Die Blotkammer wurde bis unter den Rand mit Transferpuffer aufgefüllt.
- Der Transfer der SDS-beladenen Polypeptide in Richtung der Anode erfolgte für die große Kammer 2,5 h bei 4 °C und einer konstanten Stromstärke von 100 V und 450 mA. Die Mikrokammer hatte eine Laufzeit von 4 h bei 26 V und 200 mA bei Raumtemperatur.

3.1.2.5 Coomassie-Färbung der Proteinmembran

Um die Vollständigkeit des Transfers zu prüfen, wurde die Membran im Anschluß an den Blot mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Der Transfer-nachweis erfolgte durch blaue Proteinbanden auf der Membran mit Coomassie Brilliant Blau in einem Methanol/Essigsäure-Gemisch.

Lösungen:

- **Färbelösung:**

0,25 g Coomassie Brilliant Blau R250 wurden durch Rühren über Nacht in 190 ml Entfärbelösung gelöst. Vor Gebrauch wurde die Färbelösung filtriert.

- **Entfärbelösung:**

47 % Methanol

47 % ddH₂O

6 % Essigsäure

Ablauf:

Die Membran wurde nach dem Transfer unter Schütteln 30 Minuten bis 4 Stunden in Färbelösung eingelegt und anschließend 8 bis 24 Stunden in Entfärbelösung geschüttelt, bis blaue Banden auf dem Hintergrund sichtbar waren (Positivnachweis des Transfers). Die Membran konnte entweder getrocknet oder in Plastik eingeschweißt bei 4°C gelagert werden.

3.1.2.6 Antikörperinkubation und Waschschritte

Die nach dem „Blotten“ auf eine Membran übertragen Proteine wurden anschließend mit einem Reagenz versehen, das es möglich machte, eine spezifische Aminosäuresequenz zu detektieren. Hierzu wurden Antikörper verwendet, die spezifisch mit einem antigenen Epitop des entsprechenden Proteins auf der Membran reagierten. Ein Immunglobulin erkennt unter Umständen nur eine bestimmte Konformation eines Epitops (zum Beispiel nur ein natives oder ein denaturiertes), was bedeutet, daß sich nicht alle monoklonalen Antikörper für den Western Blot eignen. Polyklonale Antiseren sind hingegen undefinierte Gemische einzelner Immunglobuline, deren Spezifität, Affinität und Konzentration oft unbekannt sind. Ob ein Antikörper für den Western Blot geeignet war und wie er eingesetzt werden sollte, mußte also für den jeweiligen Antikörper ausprobiert werden.

Als Primärantikörper wurden Antikörper aus Kaninchen (Kaninchen-Anti-Ratte IgG) verwendet: Kir6.1-AK, Kir2.1-AK, Kir2.2-AK, Kir2.3-AK. Die polyklonal, affinitätsgereinigten Antikörper Kir6.1-AK und Kir2.2 und der als Serum vorliegende Kir2.1 stammten von Professor Dr. med. Rüdiger W. Veh (2.4). Die Wahl der Ausgangskonzentrationen der Antikörper im Westernblot erfolgte nach Braun et al., 2002 und Preisig-Müller, R. (persönliche Mitteilung) sowie Harsch, S. (persönliche Mitteilung).

Desweiteren wurden Primärantikörper und entsprechende Kontrollpeptide der Firma Alomone Labs, Jerusalem, verwendet. Kir2.1^a-AK Kaninchen-Anti-Ratte IgG und Kir2.3^a-AK Kaninchen-Anti-Mensch IgG sind polyklonale, affinitätsgereinigte Antikörper, die entsprechend dem „Certificate of Analysis“ von Alomone mit einer Ausgangskonzentration von 1:200 eingesetzt wurden.

Um die Bindung des primären Antikörpers an auf der Membran gebundene Proteine nachweisen zu können, wurde ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, der gegen Immunglobulin G der jeweiligen Spezies gerichtet war, in der der Antikörper erzeugt wurde. Hierfür wurden die Antikörper AP-konjugierter Ziege Anti-Kaninchen IgG und AP-konjugierter Ziege Anti-Maus IgG eingesetzt. Als Sekundärantikörper sind sie mit dem Enzym alkalische Phosphatase

gekoppelt, deren Aktivität die Entstehung einer chemolumineszierenden Substanz verursacht, die Licht der Wellenlänge 466 nm emittiert. Diese Lichtemission konnte durch Auflegen eines Films detektiert werden.

Puffer, Lösungen und Antikörperverdünnungen:

Große Kammer:

- **TBST-Wasch-Puffer:**

1000 ml 1 x TBS (2.2) wurde mit 1 ml Tween 20 (0,1 %) versehen.

- **Block-Lösung¹:**

Zur Herstellung der Lösung wurden 2 g Magermilchpulver (2 % w/v) in 100 ml TBS gelöst oder 4 g Slim Fast (4 % w/v) in 100 ml TBS gelöst.

- **Lösungen mit AK 1 (Primärantikörper): jeweilige Endkonzentrationen der AKs**

	Kir6.1/Kir2.1/Kir2.2-AK (1:500)	β-Actin-AK (1:5000)
AK 1	20 µl	2 µl
TBST	9 ml	9 ml
Block-Lösung¹	1 ml	1 ml

- **Lösungen mit AK 2 (Sekundärantikörper):**

	AP-Ziege Anti-Kaninchen-AK (1:5000)	AP-Ziege Anti-Maus-AK (1:10000)
AK 2	2 µl	1 µl
TBST	9 ml	9 ml
Block-Lösung¹	1 ml	1 ml

Mikroammer:

- **PBST-Wasch-Puffer:**

500 ml 1 x PBS (2.2.) pH 7,4 wurde mit 250 µl Tween 20 (0,05 %) versetzt.

- **Block-Lösung²:**

0,06 g Magermilchpulver (0,2 % w/v) wurden in 30 ml Waschpuffer (PBST) gelöst.

- **Lösungen mit AK 1 (Primärantikörper): jeweilige Endkonzentrationen der Aks**

	Kir6.1/Kir2.3^a-AK	Kir2.2/Kir2.1^a-AK	β-Actin-AK
	(1:500)	(1:250)	(1:5000)
AK 1	14 µl	28 µl	2 µl
Block-Lösung²	7 ml	7 ml	10 ml

- **Lösungen mit AK 2 (Sekundärantikörper):**

	AP-Ziege Anti-Kaninchen-AK	AP-Ziege Anti-Maus-AK
	(1:5000)	(1:10000)
AK 2	6 µl	3 µl
Block-Lösung²	30 ml	30 ml

- **Negativkontrolle:**

Die Negativkontrolle für Kir2.1^a-AK und Kir2.3^a-AK von Alomone wurde mit dem korrespondierenden Kontroll-Peptid-Antigen des jeweiligen Antikörpers präinkubiert.

Antikörperinkubation und Waschschrirte (erfolgten alle auf einer Wippe):

- Die hergestellte feuchte Membran wurde aus dem Plastikrahmen (Trans-Blot Cell Assembly) genommen, halbiert und kurz in ddH₂O, anschließend 3 x kurz in 1 x TBST (1 x PBS) und 3 x 10 min in 1 x TBST (1 x PBS) gewaschen. Das Gel konnte verworfen werden. (Trocken gelagerte Nitrozellulose-Membranen werden kurz in PBS angefeuchtet, während trocken gelagerte PVDF-Membranen 5 s in Methanol gelegt und 2 x 5 min in TBS gewaschen werden müssen, bevor sie geblockt werden.)
- Um unspezifische Antikörperbindungen an die Membranen zu verhindern, wurden die Membranen 2 h unter Schütteln in 100 ml Block-Lösung¹/Block-Lösung² bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.
- Die Membranen wurden nun mit der jeweiligen Antikörperlösung des Primärantikörpers (siehe Lösungen mit AK1: AK 1 in 90 % 1 x TBST + 10 % Block-Lösung, für Mikrokammer in PBS/Teen 20/0,2 Magermilch) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.
- Anschließendes Schwenken 3 x kurz und 3 x 10 min in Waschpuffer.
- Die Inkubation mit der Antikörperverdünnung des Sekundärantikörpers (siehe Lösungen mit AK 2) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur.
- Abschließend wurden die Membranen in Waschpuffer 3 x kurz und 3 x 10 min geschüttelt. Nach der damit verbundenen Entfernung des überschüssigen Sekundärantikörpers erfolgte die Detektion der Banden.

3.1.2.7 Detektion

Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe des ImmunstarTm-AP Chemiluminescent Kit: GAR-AP detection kit. Das Detektionsmittel ImmunstarTm Substrat wurde durch die alkalische Phosphatase im AP-konjugierter Ziege Anti-Kaninchen IgG und AP-konjugierter Ziege Anti-Maus IgG dephosphoryliert. Es bildete sich ein meta-stabiles Dioxetan-Phenolat-Anion, welches in gepufferter Lösung zerfällt und Licht der Wellenlänge 466 nm emittiert. Diese

Lichtemission konnte in der Dunkelkammer durch Auflegen eines Filmes und dessen Entwicklung in Form von Banden nachgewiesen werden. Die Auflegetzeit war zwischen wenigen Sekunden und Stunden zu variieren und mußte bei jeder Entwicklung individuell bestimmt werden.

Die Detektion der Proteine wurde nach folgenden Arbeitsschritten durchgeführt:

- Die Wasch-Lösungen wurden abgegossen (3.2.2.4) und die Membranen mit der Protein-Seite nach oben auf eine Plastikfolie gelegt.
- Als Detektions-Lösung wurde 1000 µl Immunstar™ Substrat (für Nitrocellulosemembran: 950 µl Immunstar™ Substrat und 50 µl Enhancer) zu je 500 µl auf der Membran verteilt, so daß die Oberflächenspannung die Flüssigkeit auf der Membranoberfläche hielt.
- Nach Auflegen der zweiten Plastikfolie wurden alle Falten und Luftblasen entfernt und die Membran mit der Proteinseite nach oben 5 min in die Dunkelkammer gelegt.
- Währenddessen wurden die Folien zum Verschweißen je nach Membrangröße zugeschnitten und die Filmkassette vorbereitet.
- Nach der Inkubation wurde die Detektionslösung abgegossen und mit Hilfe eines Filterpapiers so abgesaugt, daß die Membran noch feucht war.
- Um das Austrocknen der Membran zu verhindern, wurden die Membranen einzeln, glatt und blasenfrei, eingeschweißt und mit der Protein-Seite nach oben in eine Filmkassette gelegt.
- In der Dunkelkammer wurde der Membran ein Film aufgelegt, die Kassette geschlossen und der Film von 1,5 bis 50 min je nach Bandenergebnis exponiert.
- Ohne den Film gegen die Membranen zu verschieben, wurde der Film aus der Kassette genommen und entwickelt.
- Anhand der Intensität der Banden nach der ersten Exposition, wurde die Expositionszeit abgeschätzt, die benötigt wurde, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Die Banden der AK wurden nach Gewebe und mit der zu erwartenden Bandenhöhe gegen die Banden des Rainbowmarkers verglichen.

3.1.2.8 „Stripping“ von Western Blot Membranen

Nach der Detektion konnten Nitrozellulose- und PVDF-Membranen mehrfach wiederverwendet und erneut mit einem Antikörper inkubiert werden. Der Proteinverlust nach der hierfür nötigen Waschprozedur (Stripping) war bei Nitrozellulose-Membranen höher als der bei PVDF-Membranen.

Puffer und Lösungen:

- **„Erasure“- Puffer:**

β-Mercaptoethanol (100 mM) 1,75 ml,
SDS (2 %) 5 g,
Tris-HCl (62,5 mM) pH 6,8 2,46 g,
wurde mit ddH₂O als 250 ml Puffer hergestellt.

- **TS-Puffer:**

Tris-HCl (10 mM) pH7,4 1,21 g,
NaCl (150 mM) 8,766 g,
wurden in ddH₂O auf 1 Liter gelöst.

- **Blockierungslösung:**

TS-Puffer 20 ml
Magermilchpulver (5 %) 1 g

„Stripping“:

Die Membran wurde mit „Erasure“-Puffer 30 bis 90 min im Hybridisierungssofen inkubiert. Die Stringenz der Waschbedingungen konnte durch Variation der β-Mercaptoethanolkonzentration im „Erasure-Puffer“ sowie durch Variation der Inkubationstemperatur und -dauer verändert werden. Die Membran wurde 2 x 10 min in TS-Puffer gewaschen und in Blockierungslösung 1 h inkubiert. Durch Auflegen eines Films wurde die Membran überprüft und dann wiederverwendet.

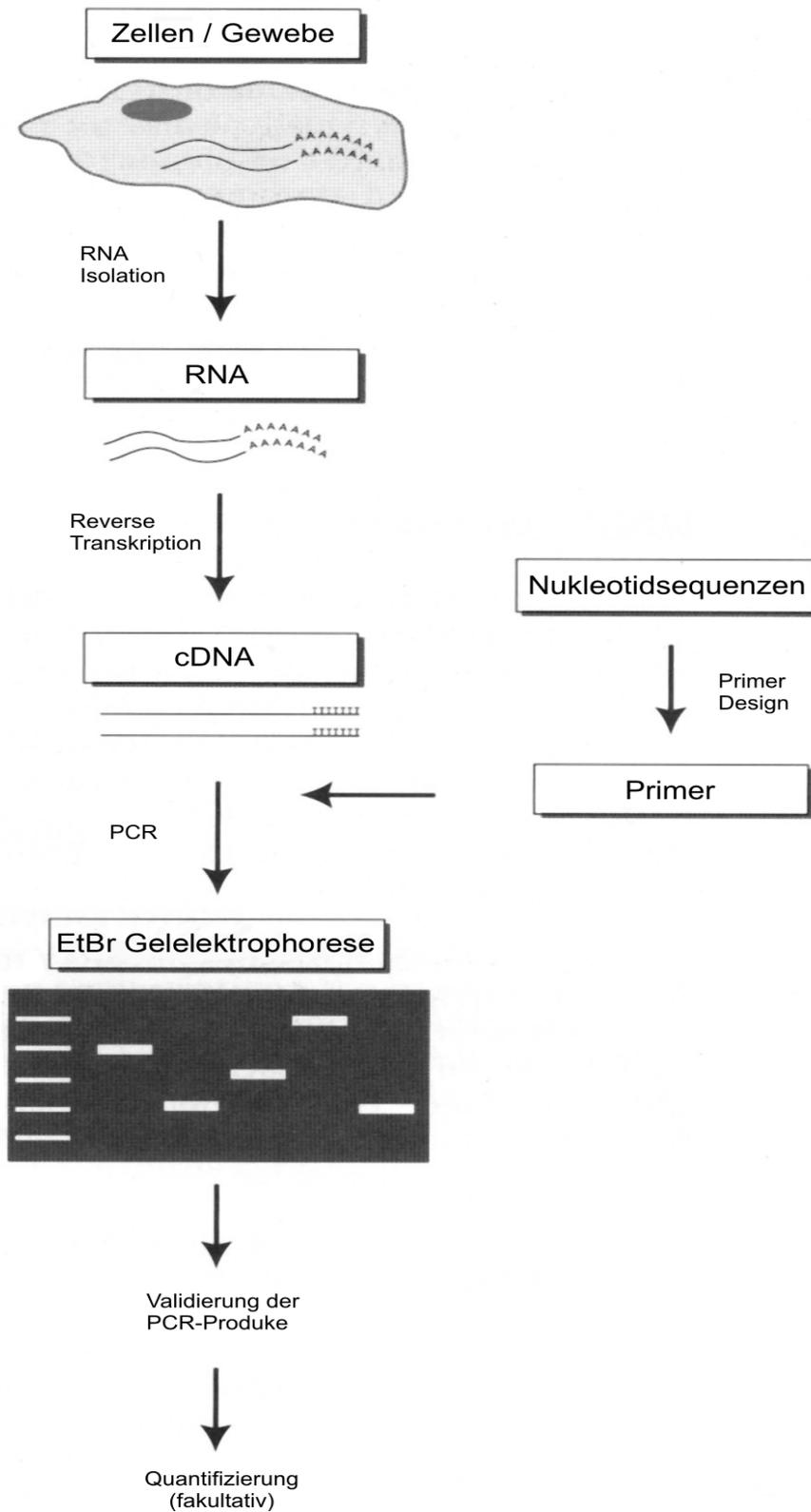


Abb. 3.2: RNA-Analyse mittels RT-PCR

3.2 RNA-Nachweis

3.2.1 RT-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion nach cDNA Synthese durch reverse Transkription)

Die Popularität der RT-PCR als Methode zur Analyse von Gen-Transkripten steigt beständig, v.a. wegen ihrer Sensitivität, aber auch weil Ergebnisse schnell zu erhalten sind und die Möglichkeit besteht, die erhaltenen PCR-Produkte zu klonieren und zu sequenzieren.

Zunächst wird RNA aus Gewebe oder Zellen isoliert und als Matrize zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription (RT) benutzt. Die so entstandene cDNA dient anschließend in der PCR als Substrat. Die Primer werden so ausgewählt, daß eine bestimmte cDNA-Region amplifiziert wird. Eine thermostabile Polymerase (Taq-Polymerase) katalysiert nach dem Denaturierungs-Schritt und dem Hybridisieren der Primer an die cDNA-Matrize („Annealing“) die Verlängerung der Primer („Extension“). Durch die zyklische Anwendung von Denaturieren, „Annealing“ und „Extension“ gelingt die Amplifikation des gewünschten cDNA-Fragments (Bloch, 1991). Dieses kann dann mittels Gelelektrophorese detektiert, identifiziert und quantifiziert werden.

3.2.1.1 Isolierung und Analyse von RNA

3.2.1.1.1 Allgemeine Bemerkungen zum Arbeiten mit RNA

RNA ist sehr empfindlich und wird in Anwesenheit von Ribonukleasen (RNasen) schnell abgebaut. Um Kontaminationen mit RNase zu vermeiden, wurde das Arbeiten mit RNA unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen durchgeführt.

Bei allen Arbeiten mit RNA wurde darauf geachtet, immer Handschuhe zu tragen, da RNasen ubiquitär vorhanden sind, besonders auf der Haut.

Desweiteren wurden RNase-freies Wasser, Pipettenspitzen mit Filter und autoklavierte bzw. RNase-frei zertifizierte Reaktionsgefäße verwendet. Sämtliche Geräte und Gefäße wurden mit 0,2 N NaOH gewaschen und mit DEPC-H₂O gespült. Alle Chemikalien haben den Reinheitsgrad „für die Molekularbiologie“; sie wurden ausschließlich für die Arbeit mit RNA benutzt. Die dNTP- und Primer-Lösungen wurden mit RNase-freiem Wasser bzw. Tris/EDTA (TE) angesetzt. Puffer wurden mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt und, wenn nötig und möglich, bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert.

Spezielle Materialien:

- DEPC-behandeltes Wasser:

Diethylpyrocarbonat (DEPC) ist ein starker RNase Inhibitor und wird als solcher gewöhnlich in einer Konzentration von 0,1 % eingesetzt. DEPC wird als Karzinogen betrachtet und sollte mit großer Vorsicht behandelt werden. Lösungen sollten unter einem Abzug hergestellt werden.

1 ml DEPC wird mit 1 l ddH₂O vermischt und unter Rühren über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Um DEPC-Rückstände vollständig zu entfernen, wird das behandelte Wasser 2 x bei 121 °C und 1 bar Überdruck 20 min lang autoklaviert, hierbei zerfällt DEPC in CO₂ und Ethanol.

- autoklaviertes ddH₂O:

A. bidest, das in der Milli-Q-Plus Filteranlage (Millipore) gereingt und anschließend autoklaviert wurde.

3.2.1.1.2 RNA-Isolierung aus der Niere und dem Gehirn

Die Isolierung der RNA aus Nieren- und Gehirngewebe von Ratten (3.2.1.1) erfolgte mit dem „peqGold RNA-Pure System“ von peqLAB. In Gegenwart eines denaturierenden GITC-Puffers wurde das Gewebe lysiert und homogenisiert. Der Puffer inaktiviert RNase und stellt die Isolation von intakter RNA sicher.

Homogenisieren des Gewebes sowie die ersten Schritte der RNA-Extraktion sind für die spätere Qualität der RNA von großer Bedeutung. Obwohl die Lösung, in der das Homogenisieren erfolgte, den starken RNase Hemmer GITC enthält, wurde so schnell wie möglich und grundsätzlich, wenn nicht anders beschrieben, auf Eis gearbeitet um einen Abbau der RNA zu vermeiden.

- Das gefrorene Gewebe wurde mit dem Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten und gewogen. In einem Eppendorf-Röhrchen wurden pro 100 mg Gewebe 1 ml peqGold RNA-Pure hinzugefügt. Das Gemisch wurde mit dem Ultraturrax homogenisiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml RNA-Pure wurde das Gewebematerial für 15 s durchmischt. Die Pipettierschritte erfolgten unter dem Abzug, da mit hepatotoxischen Substanzen (Chloroform) gearbeitet wurde.
- Das Röhrchen wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 min bei 12000 x g/ 4 °C zentrifugiert.
- Nach der Zentrifugation entstanden zwei Phasen. Die obere, wässrige (RNA-haltige) Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt. Die untere Phase (DNA und Proteine) wurde verworfen.
- Pro ml RNA-Pure wurde dem Eluat 0,5 ml Isopropanol hinzugefügt, 5 s durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Für 10 min wurde erneut bei 12000 x g/ 4 °C zentrifugiert.
- Der Überstand im Röhrchen wurde vorsichtig entfernt. Dabei war darauf zu achten, daß der entstandene RNA-Bodensatz nicht verworfen wird.
- Der Bodensatz wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, zur Re-suspendierung durchmischt und für 10 min bei 12000 x g/ 4 °C zentrifugiert.

- Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang wiederholt.
- Der entstandene extrahierte RNA-Bodensatz wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in DEPC-H₂O oder ddH₂O (200 µl pro 100 mg Gewebe) gelöst. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung (siehe 3.2.1.1.4) wurde das Eluat bei –80 °C gelagert.

3.2.1.1.3 RNA-Isolierung aus den JGZ

Zur RNA-Isolierung von JGZ aus der Ratteniere wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen gearbeitet. Die folgenden Angaben, Geräte und Puffer entsprechen dem Protokoll des RNeasy Mini Kits. Das Prinzip der Isolierung erfolgt durch Adsorption der RNA an eine RNeasy (silica-gel) Membran der RNeasy-Säule. An die Membran binden nur RNA Moleküle, die länger als 200 bp sind. Durch wiederholte Waschvorgänge mit speziellen Puffern des Kits (RWI und RPE) werden Verunreinigungen entfernt. Die RNeasy-Säule wird nach jedem Waschvorgang in ein neues Gefäß eingesetzt, bis man reine RNA im Eluat erhält.

- Etwa 3 Millionen der isolierten JGZ (freundlicherweise überlassen von Dr. Benöhr) wurden zentrifugiert und der Überstand abgegossen.
- Dem Homogenat wurden 350 µl des RNeasy Lysis Puffers zugegeben und mit der Pipette gemischt.
- Zur Homogenisierung der lysierten Zellen wurde das Gemisch durch eine 22 G (0,99 mm) Nadel gezogen und mit 350 µl 70 % Ethanol gemischt.
- Das Lysat wurde mit der Pipette auf die RNeasy Säule aufgetragen und für 15 s bei 10 000 x g/ 4 °C zentrifugiert.
- Nach Waschen des Bodensatzes mit 700 µl RWI-Puffer und Zentrifugieren, für 15 s bei 10000 x g, wurde die Säule in ein neues 2 ml Gefäß eingesetzt.
- Unter Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und Zentrifugation, für 15 s bei 10000 x g, erfolgte ein neuer Waschschrift.
- Wechseln des Durchflußgefäßes und Zugabe von 500 µl RPE-Puffer.

- Um die RNeasy Membran zu trocknen wurde für 2 min zentrifugiert.
- Erneutes Einsetzen der RNeasy Säule in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß.
- Nach Zugabe von 30-50 µl RNase freiem ddH₂O und Zentrifugation, für 1 min bei 10000 x g erhielt man die gebrauchsfertige RNA im Eluat.

3.2.1.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte bei dem Absorptionsmaximum von RNA bei 260 nm in einem Einkanal-UV-Vis-Spektrometer. Da RNA einzelsträngig vorliegt, entspricht eine Extinktion von 1 einer RNA-Menge von 40 µg/ml. Daraus ergibt sich folgende Formel zur Konzentrationsermittlung:

$$c(\mu\text{g/ml}) = \text{OD} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Dementsprechend wurde die RNA-Konzentration photometrisch durch Verdünnung von 4 µl RNA mit 96 µl ddH₂O/DEPC-Wasser und Messung der optische Dichte (OD) bei 260 und 280 nm gegen ddH₂O/DEPC-Wasser ermittelt. Die erhaltene Konzentration in µg/ml wurde für die durchgeführten PCRs so umgerechnet, dass eine RNA-Menge von 1 µg RNA für die cDNA Synthese eingesetzt wurde.

Die Reinheitskontrolle der Nukleinsäure-Lösung erfolgte mittels dem Quotient E_{260}/E_{280} (Absorptionsmaxima von RNA/aromatischen Aminosäuren) und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Niedrigere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin (Benöhr, P., persönliche Mitteilung). Zu beachten war, daß für in ddH₂O bzw. DEPC-Wasser gelöste RNA im allgemeinen niedrigere Werte als für RNA, die in TE-Puffer gelöst wurde, errechnet werden. Um verlässliche Messwerte zu erhalten, waren Mehrfachbestimmungen für die photometrische Konzentrationsbestimmung angeraten, da durch zähflüssige RNA-Lösungen bei der Verdünnung häufig Pipettierfehler auftreten können.

3.2.1.2 Reverse Transkription aus RNA - cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Herstellung findet eine reverse Transkription der mRNA in cDNA mit degenerierten verankerten Oligo(dT)-Primern statt. Bei dieser Einstrang-Synthese erhält man ein cDNA-RNA-Hybrid. Die Transkription wird umgekehrt und die Sequenzabfolge der mRNA wird durch das Enzym Reverse Transkriptase in die komplementäre DNA umgeschrieben.

Für die Reverse Transkription wurde folgender Ansatz pro Probe verwendet:

	Komponenten	Volumen / Reaktion	
PCR-Mix:	10 x PCR-Puffer (PanBiotech)	2,0 µl	
	MgCl ₂ (50 mM)	2,0 µl	
	dNTPs (10 mM)	2,0 µl	
	RNAse-Inhibitor (40 U/µl)	1,0 µl	
	Oligo-Primer	0,5 µl (250 µg)	
	Random Primer (0,1 M)	0,5 µl	
RNA-Ansatz:	Gesamt-RNA	1,0 µg (0,5 - 5 µg)	
	ddH ₂ O	ad RNA	
Enzym:	Reverse Transkriptase (250 U/µl) (Preqlab)	0,5 µl	
		20 µl (Gesamtvolumen)	

Im folgenden 20 µl Reaktionsansatz konnten bis zu 5 µg Gesamt-RNA revers transkribiert werden.

Der Standardeinsatz der Gesamt-RNA je Gewebe zur Amplifikation der Kir-Kanäle betrug 1 µg. Dieser wurde je nach Konzentration mit ddH₂O auf ein Volumen von 11,5 µl aufgefüllt.

Ein zusätzlicher Ansatz (Leerwert-LW) enthielt zwar alle RT-Reagenzien, aber keine Gesamt-RNA („Leer-Transkript“), um später in der PCR die Komponenten der RT-Reaktion auf Kontamination überprüfen zu können.

RNA-Ansatz für 1 µg Gesamt-RNA:

	RNA	ddH₂O
1. JGZ	5 µl	6,5 µl
2. Niere	0,99 µl	10,51 µl
3. Gehirn	2,5 µl	9 µl
4. LW	---	11,5 µl

Die Substanzen wurden in angegebener Reihenfolge auf Eis in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäß pipettiert und gut durchmischt.

Alle Proben wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription bei Inkubation der Proben für 1 h bei 42 °C im Wasserbad. Die Transkription wurde durch Denaturierung der Proben für 5 min bei 95 °C gestoppt und die Proben nach kurzem Zentrifugieren auf Eis gelagert. Die erhaltene cDNA Proben konnten entweder direkt in die PCR eingesetzt oder bei –20 °C gelagert werden.

Je 15 µl der gewonnenen cDNA dienten zur Amplifikation der Kir-Kanäle, die verbleibenden 5 µl wurden zur Amplifikation der Kontrolle durch das „housekeeping“-Gen β -Actin oder Cyclophilin eingesetzt. Zu jedem Amplifikationsansatz der Kir-Kanäle und des β -Actins/Cyclophilins wurde der Leerwert mitgeführt.

3.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction; PCR) ist eine in vitro-Technik zur Vervielfältigung (Amplifikation) und zum Nachweis gezielter Nukleinsäuresequenzen, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden. Um DNA mit Hilfe einer PCR amplifizieren zu können, benötigt man als Starthilfe Oligonucleotide oder Primer (kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, sog. Amplimer), die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (template) sind. Ferner benötigt man Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und eine spezielle DNA-Polymerase, die ursprünglich aus thermostabilen Bakterien gewonnen wurde (Bakterium *Thermus aquaticus*; „Taq“). Durch Erhitzen der DNA-Matrize auf $> 90\text{ °C}$ wird die Zielsequenz in Einzelstränge zerlegt. Nach Abkühlung auf $37\text{-}65\text{ °C}$ können sich die Primer anlagern, indem die komplementären Sequenzen mit jeweils einem Strang der DNA hybridisieren und den zu amplifizierenden Genabschnitt umrahmen (Annealing). Ausgehend von den Primern beginnt die Extensions-Periode. Hierbei werden mit Hilfe der DNA-Polymerase und in Gegenwart der dNTPs, entlang der nun einzelsträngigen DNA-Matrize in beide Richtungen komplementäre DNA-Stränge neu synthetisiert. So entstehen erste Kopien der Zielregion. Dieser Zyklus wird 20-40 mal wiederholt. Das zyklische Erhitzen und Abkühlen wird vom Thermocycler übernommen.

Bei der PCR werden zwei Primer verwendet. Einer, der am sense-Strang und ein zweiter, der am Gegenstrang, dem antisense-Strang, bindet. Am Ende eines jeden Zyklus hat dementsprechend eine Verdopplung des von den beiden Primern eingerahmten DNA-Abschnittes stattgefunden. Somit ist die exponentielle Amplifikation von DNA ermöglicht.

3.2.1.3.1 PCR-Ansatz für Kir-Kanäle und Positivkontrolle

Aufgrund des exponentiellen Charakters der PCR mußten selbst kleinste Verunreinigungen von Reagenzien und Materialien mit PCR-Produkt vermieden werden. Das Pipettieren des PCR-Ansatzes fand räumlich getrennt von der Analyse des PCR-Produkts und mit einem hierfür reservierten Pipettensatz statt. Alle für die PCR bestimmten Reagenzien wurden in Aliquots gelagert.

Bei jeder PCR-Durchführung mit Kir-Primern wurden parallel Positiv- und Negativansätze mitgeführt. Als Positivkontrolle diente β -Actin, ein Zytoskelett-Protein sowie Cyclophilin, ein ubiquitär exprimiertes zyklisches Polypeptid, das an Cyclosporin (ein Immunsuppressivum) bindet. Beide dienten als „house-keeping“-Gene zur Überprüfung der Bedingungen der jeweiligen RT-PCR. Die Negativkontrolle diente der Überprüfung der RT-Reagenzien auf Kontamination. Zur Standardüberprüfung wurde die cDNA-Probe durch „Leer-Transkript“ (Leerwert) ersetzt (3.2.1.2).

Bei der Amplifizierung wurden folgende Parameter variiert:

- **cDNA von Gewebe:** rev. transkribierte Ges.-RNA aus JGZ, Niere und Gehirn der Ratte
- **Primer (siehe Kap. 2.5):** Kir2.1 sense und antisense
Kir2.2 sense und antisense
Kir2.3* sense und antisense
- **Einsatz an MgCl:** 1.5 mM bis 5.5 mM
- **Positivkontrolle (siehe Kap. 2.5):** β -Actin sense und antisense
Cyclophilin sense und antisense
- **Negativkontrolle:** Zur Überprüfung der PCR-Reagenzien auf Kontamination, wurde die cDNA-Probe durch „Leer-Transkript“ (Leerwert; siehe 3.2.1.2) oder Ampuwa (steriles bidest. Wasser) ersetzt. Um Verunreinigung der in der RT-Reaktion eingesetzten RNA mit DNA zu überprüfen, wurde die cDNA-Probe durch nicht revers transkribierte RNA ersetzt oder keine Reverse Transkriptase hinzugefügt.

Der PCR-Mix wurde für alle Reaktionen, die unter den gleichen Bedingungen ablaufen sollten, gemeinsam in einem 1,5 ml Reagenzgefäß angesetzt, gemischt und anschließend auf die einzelnen Reagenzgefäße mit den unterschiedlichen cDNA Proben (je 15 µl), Positivkontrolle (je 5 µl), aus JGZ, Niere und Gehirn und dem Leerwert verteilt.

Für eine Standard-PCR-Reaktion wurden folgende Komponenten auf Eis in der angegebenen Reihenfolge gemischt:

	Komponenten	Volumen/Reaktion Kir-2.x	Volumen/Reaktion β-Actin/Cyclophilin
PCR-Mix:	10 x PCR-Puffer	4,0 µl	4,0 µl
	MgCl ₂ ^a (50 mM)	-	-
	Primer-sense (25 pmol/µl)	2,0 µl	2,0 µl
	Primer-antisense (25 pmol/µl)	2,0 µl	2,0 µl
	A. bidest (steril)	26,5 µl	36,5 µl
cDNA:	rev. transkribierte Ges.-RNA	15 µl	5 µl
Enzym:	Taq-Polymerase (Pantech)	0,5 µl (2,5 U)	0,5 µl (2,5 U)
		50 µl (gesamt)	50 µl (gesamt)
^a Die MgCl ₂ -Konzentrationen wurde während der Optimierung der PCR-Bedingungen zwischen 1,5 und 5,5 mM variiert.			

3.2.1.4 Temperatur-und Zeitverlauf des Thermocyclers

Der zyklische Temperaturverlauf der PCR besteht aus drei Stufen. Die erste Temperaturerhöhung dient der Denaturierung der DNA in Einzelstränge (> 90 °C). Bei der Anlagerung, dem Annealing, der Primer wird der Reaktionsansatz auf eine Temperatur, in Abhängigkeit von der T_m der Primer, gesenkt (37-70 °C). Die Anlagerung des Primers ist ausschlaggebend für die Spezifität der gesamten PCR. Anschließend verlängert die hitzestabile DNA-Polymerase die

Primer bei 72 °C, dem Aktivitätsoptimum der Taq-Polymerase. Die 3-Schritt PCR wird abhängig von dem zu amplifizierenden Kir-Kanal 20–40 mal wiederholt. Im letzten Zyklus wird der Syntheseschritt auf 10 Minuten verlängert, damit die Polymerase alle Stränge zu Ende synthetisieren kann.

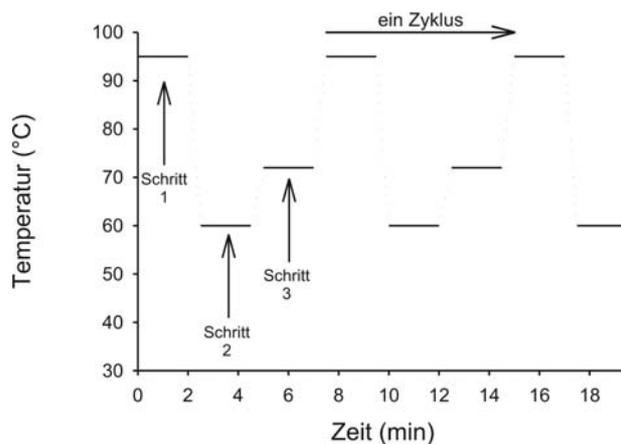


Abb.3.3: zyklischer Temperaturverlauf eines Thermocyclers

Das „PCR-Programm“ für den Thermocycler wird im folgenden dargestellt:

Denaturieren der cDNA-Matrize zu Beginn:	3 min	94 °C
3-Schritt PCR:		
Denaturieren:	1 min	94 °C
„Annealing“ ^a :	1 min	55–60 °C
„Extension“:	3 min	72 °C
Zahl der Zyklen ^b :	32-40	
final Extension	10 min	72 °C
^a Für jedes Primer-Paar wurde die optimale „Annealing“-Temperatur ermittelt.		
^b Die Zahl der Zyklen wurde je nach Primer-Paar ausgetestet		

Zur Optimierung der PCR wurde je nach Kir-Primer, neben der Variation der MgCl₂-Konzentration, die „Annealing“-Temperatur und die Anzahl der Zyklen ausgetestet. Nach Beendigung des PCR-Programms wurden die Proben über Nacht bei 4 °C oder längerfristig bei –20 °C gelagert.

3.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist zum Nachweis der in der PCR amplifizierten DNA eine häufig eingesetzte Methode. Für die Auftrennung der doppelsträngigen, DNA-Fragmente eignet sich das Agarose-Gel. Dieses Gel trennt die Nucleinsäuren durch seine Porenstruktur der Größe nach auf. Durch die Phosphatgruppen erhält die DNA eine negative Ladung und wandert nach Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung Anode. Die Laufgeschwindigkeit des Amplikons verhält sich proportional zum Logarithmus seiner Molmasse. Die Dichte des Gels bestimmt ebenfalls die Laufgeschwindigkeit. Entsprechend eignen sich höherprozentige Gele besser für kleinere DNA-Fragmente.

Als Laufpuffer kann sowohl 1 x TAE als auch 1 x TBE verwendet werden.

Lösungen und Puffer:

- **10 x DNA-Ladepuffer:**

0,2 % (w/v) Bromphenolblau 20 mg,

25 % Glycerin 2,5 ml,

50 x TAE 400 µl,

werden mit 10 ml ddH₂O aufgefüllt.

Durch den Ladepuffer wird die Dichte der Probe erhöht und ihr Einsinken in die Geltasche ermöglicht. Er färbt die Probe und erleichtert damit das Auftragen auf das Gel. Die in ihm enthaltenen Farbstoffe wandern mit reproduzierbarer Geschwindigkeit zur Anode.

- **Molekulargewichtsstandard (MWS; DNA Molecular Weight Marker XIV):**

4 µl Marker (1 µg) werden mit 2 µl Ladepuffer versetzt und mit 12 µl ddH₂O auf 18 µl aufgefüllt. Der Längenstandard wird vollständig in eine Geltasche gefüllt.

- **Agarose-Gel:**

	1%	1,5%	2%
Agarose	500 mg	750 mg	1000 mg
1 x TAE/1 x TBE-Puffer	50 ml	50 ml	50 ml
Ethidiumbromidlösung	2 µl	2 µl	2 µl

Gießen des Gels:

Das Volumen der herzustellenden Agarose-Lösung wurde der Größe des jeweiligen Gelträgers angepaßt. Ein Gelträger für die DNA Mini-Cell Kammer faßte 50 ml. Je nach Prozentansatz des Agarosegels wurde die Agarose mit 1 x TAE- oder 1 x TBE-Puffer auf 50 ml aufgegossen und im Mikrowellenherd so lange erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst war. Verdampfte Flüssigkeit wurde mit A.bidest ersetzt und die Lösung auf 60 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid-Stammlösung wurde sie in den Gelträger der Kammer gegossen und setzte den gewünschten Kamm zur Aussparung der Geltaschen ein. Danach ließ man das Gel mindestens 30 min erkalten und fest werden. Der Kamm wurde entfernt und das Gel mit dem Gelträger entsprechend der Stromrichtung um 90 ° in der Kammer gedreht. Abschließend wurde die Gelkammer mit 1 x TAE/1 x TBE gefüllt, bis das Gel 3-5 mm mit Puffer bedeckt war.

Probenvorbereitung:

- Die Proben wurden jeweils mit 4 µl Ladepuffer (siehe 10 x DNA-Ladepuffer) versehen und geschüttelt. Anschließend wurden die Proben und der Molekulargewichtstandard vollständig in die Geltaschen gefüllt.

Gel-Lauf und Dokumentation des Ergebnisses:

Für die Elektrophorese wurde eine konstante Spannung von 100 V angelegt, so daß das Gel für 50-60 Minuten bei 400 mA lief. Während des Laufs interkalieren Ethidiumbromid-Moleküle in die DNA-Helix, die dann fluoresziert. Diese Fluoreszenz der gefärbten DNA wird mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm angeregt. Mit Hilfe des Gel-Dokumentation-Systems wurden die Banden dokumentiert und ausgewertet.

3.2.1.6 Amplifikationsprodukte

Die Banden konnten mit Hilfe der Basenpaare anhand des Molekulargewichtsstandards (DNA Molecular Weight Marker XIV) identifiziert werden. Die Stranglängen der Amplifikationsprodukte betragen:

Kir-2.1	326 bp
Kir-2.2	836 bp
Kir-2.3*	916 bp
β -Actin	372 bp
Cyclophilin	257 bp

3.2.1.7 Semiquantitative RT-PCR

Zur Analyse der Gen Expression wurde die semiquantitative RT-PCR verwendet. Die Sensitivität einer PCR ist weit größer, als die herkömmlicher RNA-Blot Techniken (Wang et al., 1989), was die Möglichkeit eröffnet, auch sehr seltene mRNA Spezies zu detektieren. Die sehr hohe Sensitivität dieser Methode führt jedoch auch dazu, daß es schwierig ist, quantitative Informationen mit Hilfe der RT-PCR zu erhalten. V.a. die zwei beteiligten enzymatischen Reaktionen, die reverse Transkription der RNA in DNA (3.3.1.2) und die Polymerase-Ketten-Reaktion (siehe 3.2.1.3), stellen ein Problem dar. Die exponentielle Amplifikation des PCR-Produkts während der PCR führt zu gravierender Verstärkung von ursprünglich nur kleinen Fehlern. Trotzdem kann die RT-PCR gute quantitative Ergebnisse liefern, wenn die Methode entsprechend modifiziert wird (Clontech Lab.Inc., 1993; Köhler et al., 1995).

3.2.1.7.1 Semiquantitative Auswertung der Banden

Die Quantifizierung von PCR-Produkten wird mit Hilfe von internen Standards durchgeführt. Um Unterschiede zwischen dem Inhalt verschiedener Reagenzgefäße (Ladefehler, Pipettierfehler, etc.) abschätzen zu können, wird eine Sequenz, die in allen zu untersuchenden Proben gleich exprimiert ist, als Standard amplifiziert (Cyclophilin CP). Geht man davon aus, daß die optische Dichte (integrierte optische Dichte: ODI) der Bande im Gel proportional zur Menge des PCR-Produkts ist, kann das Verhältnis Probe zu Standard berechnet werden.

Auswertung der semiquantitativen PCR:

Das Ethidiumbromid-gefärbte Gel wurde mit Hilfe des Gel-Dokumentations-Systems digitalisiert und als Bilddatei gespeichert. Die integrierte optische Dichte (ODI) der aufgetragenen Banden des Gels wurde mit der integrierten Software bestimmt und die Werte in ein Tabellenkalkulationsprogramm importiert. Aus den Ergebnissen der aufgetragenen Banden des hier ausgewerteten Gels wurde der Mittelwert gebildet (alle Cyclophilin-Werte dividiert durch Anzahl der Proben). Die relative mRNA Expression in der jeweiligen Probe wurde aus dem Quotienten von Kir2.x mRNA und des „housekeeping“-Gens Cyclophilin mRNA für jedes Experiment berechnet und mit den Ergebnissen des Mittelwerts multipliziert. Zur Veranschaulichung werden die Ergebnisse in dieser Arbeit mit Hilfe des Programms Sigma Plot als Balkendiagramm dargestellt.

Die entsprechend ermittelten Werte für die relative mRNA Expression geben jeweils nur Auskunft über die Verhältnisse in dem einzelnen durchgeführten Experiment (Gel). Die hier gezeigten Ergebnisse (Abb. 4.15, Abb. 4.17 und Abb. 5.1) dürfen daher nicht überbewertet werden, da sie jeweils nur von einer Probenaufbereitung (Gel) stammen.

4 ERGEBNISSE

Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekulare Charakterisierung von Kir6.1 und der Kir2.x-Subtypen in reninsezernierenden juxtaglomerulären Zellen (JGZ) der Niere von NaCl-arm ernährten Ratten. Um ein möglichst aussagekräftiges Expressionsprofil zu erstellen, wurden die Kir-Kanäle auf Protein- und auf RNA-Ebene untersucht. Der Nachweis auf Proteinebene erfolgte durch immunhistochemische Färbungen an Kryoschnitten und wurde mit der proteinchemischen Methode des Western Blottings ergänzt. Untersuchungen auf RNA-Ebene wurden mittels semiquantitativer RT-PCR erbracht.

4.1 Protein- und Immunhistochemische Ergebnisse auf Proteinebene

4.1.1 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen

Als Hauptquelle des Renins stellen die reninsezernierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparates (JGA) der Niere eine elementare Komponente des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) im Organismus dar. Sie sind in der Media der afferenten Arteriole lokalisiert und befinden sich dort überwiegend am Gefäßpol (Abb. 4.1). Diese Region stand im Fokus der Untersuchungen.

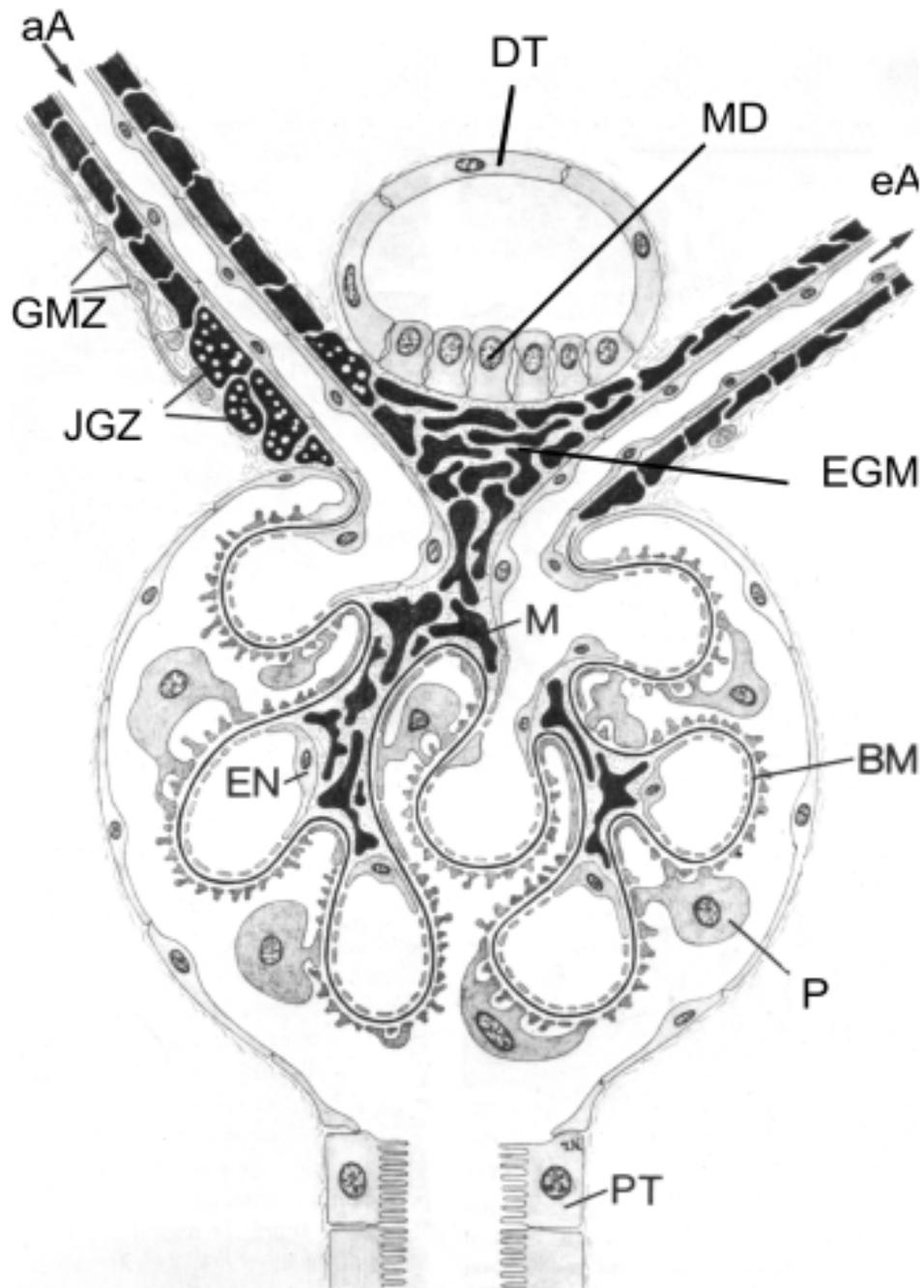


Abb. 4.1: Schematischer Querschnitt durch ein Glomerulum und den juxtaglomerulären Apparat. Die granulierten juxtaglomerulären Zellen (JGZ) sind in der Media der afferenten Arteriole (aA) lokalisiert. Ihnen benachbart liegen glatte Muskelzellen (GMZ), extraglomeruläre Mesangiumzellen (EGM) sowie Macula densa Zellen (MD) im distalen Tubulus (DT), welche am vaskulären Pol zwischen afferenter und efferenter Arteriole (eA) lokalisiert sind. Die Kapillarschlingen ziehen mit ihrem Endothel (EN) und ihrer Basalmembran (BM) durch das Glomerulum. Ihnen benachbart liegen die Podozyten (P) und die Mesangialzellen (M). Am anderen Pol geht das Glomerulum in den proximalen Tubulus (PT) über (Koushanpour und Kriz, 1986).

4.1.1.1 Vorversuche mit Adenosin-A1-Rezeptor-AK

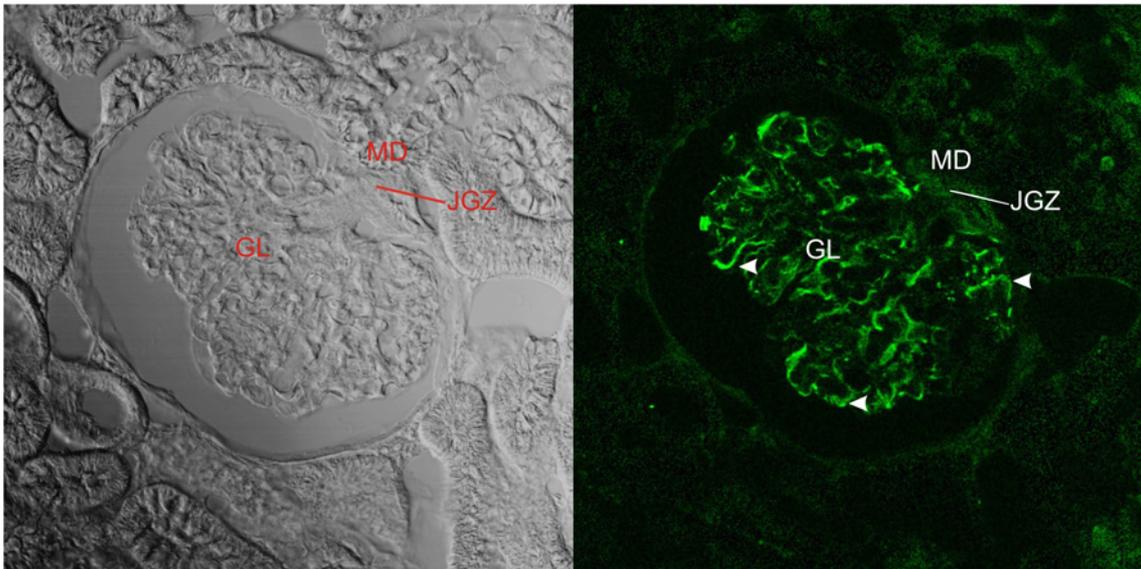
Zur Prüfung der Färbemethode wurden Immunfärbungen sowohl an Kryoschnitten der Rattenniere, als auch an isolierten reninsezernierenden Zellen der Ratte mit Adenosin-A1-Rezeptor-AK durchgeführt. Der Adenosin-A1-Rezeptor ist ein Subtyp der membranständigen Adenosinrezeptoren der reninhaltigen JGZ (Weaver und Reppert, 1992; Eisold, 2003), über die Adenosin seine Wirkung entfaltet (Kurtz et al., 1988, Spielman und Arend, 1991).

Mittels Immunfärbungen an Kryoschnitten der Rattenniere konnte von Rauch 2000 (unveröffentlichte Befunde) der A1-Rezeptor in der afferenten Arteriole der Rattenniere lokalisiert werden, was als Grundlage der Vorversuche dient.

Abbildung 4.2A und B zeigen Schnitte durch die Niere einer Ratte, fokussiert auf das Glomerulum mit dazugehörigem juxtaglomerulären Apparat aus Macula densa, Mesangium und JGZ. Links ist jeweils die Hellfeld-, rechts die Fluoreszenzaufnahme in Grün dargestellt. Beide Schnitte stammen, wie alle Nierenschnitte in dieser Arbeit von kochsalzarm ernährten Ratten. Zu erkennen ist eine deutliche Fluoreszenz als Grünfärbung, welche sich in den Glomeruli beider Schnitte lokalisiert. Innerhalb des Glomerulums zieht diese Fluoreszenz girlandenartig durch den Innenraum der Baumannschen Kapsel und bildet peripher typische „blumenkohlartig“ Strukturen, die auf eine Anfärbung der Podozyten (◀) schliessen lassen (Albinus, Rauch, persönliche Mitteilung).

In Abbildung 4.2B ist zudem eine in den umliegenden Tubuli grün-„getüpfelte“ Färbung, als mögliche Mitochondrienfärbung (↑), und der Bereich des juxtaglomerulären Apparates mit wahrscheinlich JGZ (vgl. Abb. 4.1) am oberen Pol des Glomerulums als Grünfärbung hervorgehoben. Vergleichend dazu ist in Abbildung 4.2A die Färbung v.a. im Bereich der JGZ nuanciert ausgeprägt. Dieser Unterschied ist auf die in Abbildung 4.2A vorliegende Schnittführung zurückzuführen, bei der das fokussierte Glomerulum mit zugehörigem juxtaglomerulären Apparat und JGZ vom Zentrum peripher getroffen ist und das Glomerulum Richtung Cortex der Niere liegt.

A



B

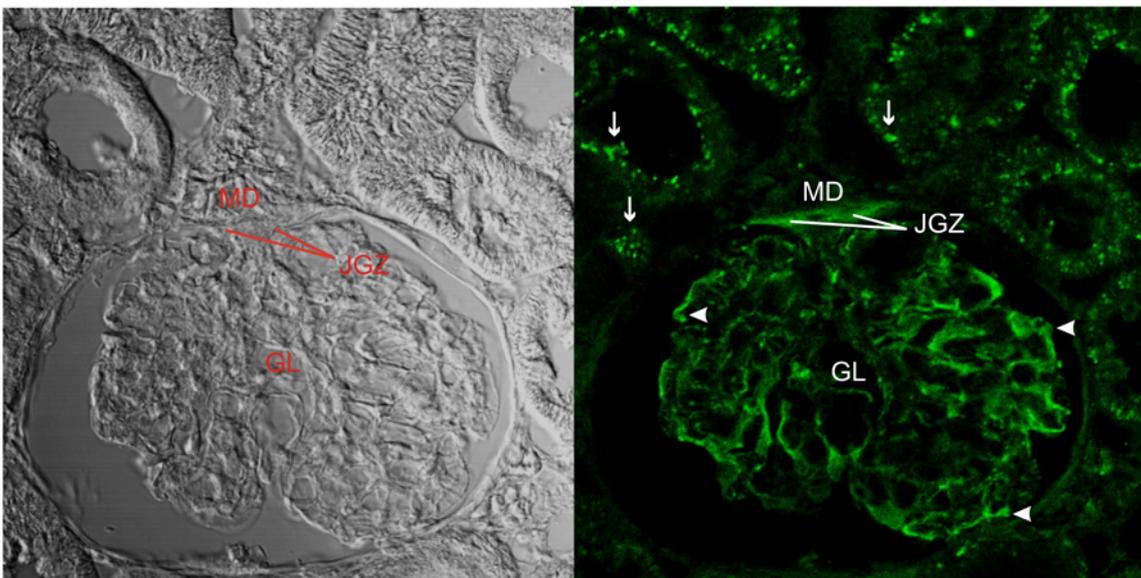
100 μ m

Abb. 4.2A und B: Immunolokalisation des Adenosinrezeptors A1 im Glomerulum und Tubuli. Die Färbung scheint Podozyten (\blacktriangleleft), JGZ und Mitochondrien (\uparrow) einer kochsalzarm ernährten Ratte zu markieren. (A) zeigt einen peripheren Schnitt, (B) einen medialen Schnitt, bezogen auf das Glomerulum mit juxtaglomerulärem Apparat und JGZ. Die Kryoschnitte wurden mit einem Kaninchen Anti-Adenosinrezeptor-A1 Antikörper in Verbindung mit Alexa 488 Ziege Anti-Kaninchen IgG (grün) gefärbt. Der Maßstab in Abb. 4.2A gibt 100 μ m an. GL, Glomerulum; MD, Macula densa; JGZ, juxtaglomeruläre Zellen.

Die positive Lokalisation des Adenosin-A1-Rezeptors an Kryoschnitten im Bereich des Gefäßpols der afferenten Arteriole stellte die Voraussetzung für Untersuchungen von A1-Rezeptoren an frisch isolierten reninsezernierenden Zellen der afferenten Arteriole (Albinus et al., 1998) dar. Entsprechend des immunhistologischen Nachweises von Reninvesikeln an reninsezernierenden Zellen (Rauch, 2000) wurde die Methode der Immunfluoreszenz an frisch isolierten reninsezernierenden Zellen für A1-Rezeptoren modifiziert (siehe 3.1.1.4). Mit dem Anti-Adenosin-A1-Rezeptor Antikörper war die Lokalisation der A1-Rezeptoren in der Membran an frisch isolierten reninsezernierenden Zellen möglich (Abb. 4.3). Das Hellfeldbild links stellt mehrere reninsezernierende Zellen dar, die sich als Zellgruppe plastisch vor dem Hintergrund abheben. Im mittleren und rechten Bild stellen sich die A1-Rezeptoren entsprechend ihrer Lokalisation in der Zellmembran ringförmig als grüne Fluoreszenz am Zellrand dar. Es färben sich nur die im Vordergrund liegenden runden Zellen an, da möglicherweise der Fokus Zellen in tiefer liegenden Ebenen nicht mehr erfassen kann oder die Permeabilität tiefer liegender Zellen nicht ausreichend gewährleistet wird.

Durch Immunfärbungen an HEK 293-Zellen wurde die Spezifität des verwendeten Primärantikörpers getestet. Die Vermutung, daß die immortalisierten Endothelzellen aus der embryonalen Rattenniere keine Adenosin-A1-Rezeptoren in ihrer Zellmembran exprimieren (Hambrock, persönliche Mitteilung), konnten diese Ergebnisse bestätigen (Abb. 4.4). Die Zellen, die in ihrer Morphologie mit ihrer länglichen und für sie typische spindelförmige Silhouette imponieren, weisen zwar eine rote Zellkernfärbung, aber keine spezifische Fluoreszenz der Adenosin-A1-Rezeptoren auf. Diese Ergebnisse zeigen, daß sowohl Doppelfärbungen mit Kryoschnitten als auch Färbungen von isolierten JGZ der Ratte für die immunhistochemische Identifikation der zu untersuchenden Kaliumkanäle geeignet wären. Um die Lokalisation der Kanäle in der Niere zu erforschen, ist jedoch die Immunfluoreszenzfärbung an Kryoschnitten als Methode vorzuziehen, da die gesamte Nierenmorphologie beurteilt und eindeutiger Aussagen über Fluoreszenzstärke und -verteilung sowie Homogenität gemacht werden können.

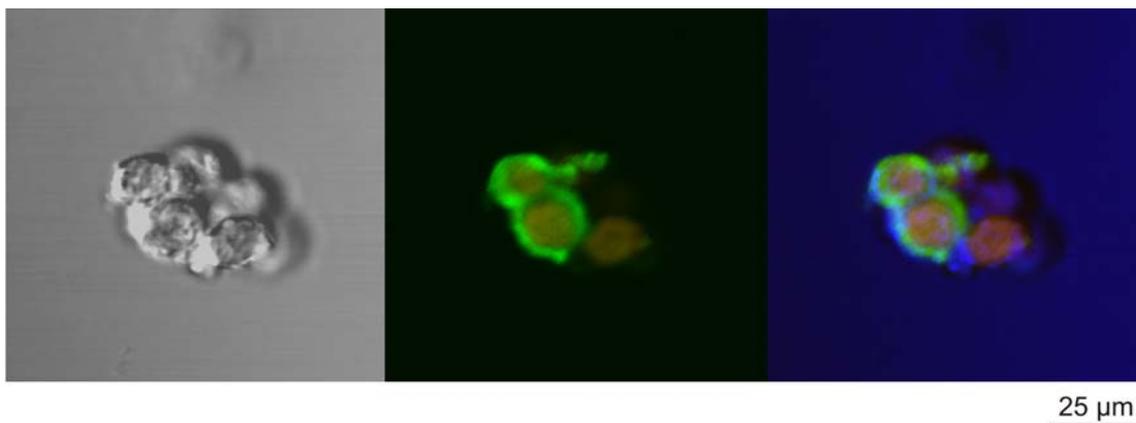


Abb. 4.3: Zellgruppe mit isolierten reninsezernierenden Zellen aus der Niere einer kochsalzarm ernährten Ratte.

Hellfeldbild links mit reninsezernierenden Zellen. Die Fluoreszenzfärbungen mitte und rechts mit blauem Durchlichtbild stellen die Adenosin-A1-Rezeptoren in der Membran der anterior gelegenen Zellen als grüne ringförmige Strukturen dar. Die homogene Rotfärbung markiert den intrazellulär gelegenen Zellkern. Die Zellen wurden mit Kaninchen Anti-AdenosinA1-Rezeptor IgG in Kombination mit 488 Ziege Anti-Kaninchen IgG (grün) sowie dem Nukleinsäurefarbstoff SYTO 62 (rot) gefärbt. Der Maßstab gibt 25 µm an.

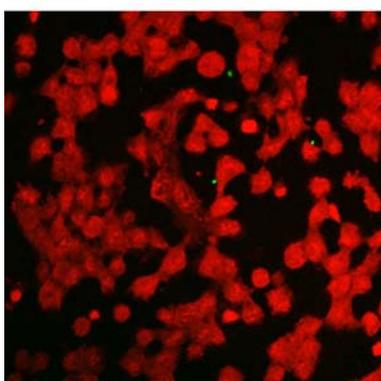


Abb. 4.4: Immunhistologische Färbung von HEK293-Zellen, immortalisierte Endothelzellen aus der embryonalen Ratten-niere. Im Zellinneren ist der Zellkern als rote Fluoreszenz zu erkennen. Grüne Fluoreszenzfärbung ist nicht vorhanden. Die Zellen wurden mit Kaninchen Anti-AdenosinA1-Rezeptor IgG in Kombination mit Alexa 488 Ziege Anti-Kaninchen IgG (grün) und SYTO 62 (rot) gefärbt. Der Maßstab gibt 50 µm an.

50 µm

4.1.1.2 Immunfluoreszenz mit Kir-AK

4.1.1.2.1 Lokalisation der Kir-AK in den JGZ und dem Glomerulum

Die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle konnten mittels Doppelfärbungen mit „von Willebrand Faktor“ an Kryoschnitten der Niere sowie im Gehirn der Ratte (siehe 4.1.1.3) in ihrer Lokalisation dargestellt werden. Die Verteilung der verschiedenen Kir-Subtypen, Kir6.1, Kir2.1 und Kir2.2 in Niere und Gehirn ist in Abbildung 4.5-4.12 veranschaulicht und in Tabelle 1 dargestellt. Die Spezifität aller drei Kir-Antikörper wurde im Westernblot untersucht. Unspezifischer Hintergrund wurde durch Präimmunadsorption mit Normalseren (NGS, NKS oder NDS) reduziert, indem Bindungen des fluoreszierenden Sekundärantikörpers an nicht erwünschten Epitopen verhindert wurden.

Kir6.1

Kir 6.1 bildet die porenformende Untereinheit des vaskulären K_{ATP} -Kanals. Die Frage nach einer genauen Lokalisation von Kir6.1 in reninsezernierenden JGZ der afferenten Arteriole bzw. dem JGA der Rattenniere kann mittels Doppelfärbung des Kanals Kir6.1 mit „von Willebrand Faktor“ dargestellt werden (Abb. 4.5). Die Bildkomposition in Abbildung 4.5 setzt sich aus den einzelnen Farbkanälen Rot (von Willebrand) und Grün (Kir-Kanal), dem Durchlichtbild und dem überlagerten Gesamtbild zusammen. Das Durchlichtbild, links unten, zeigt ein Glomerulum mit JGA, JGZ, Macula densa und umliegenden Tubuli. Im Kontrast zur Eigenfluoreszenz der Tubuli in der Niere, kann Kir6.1 als verstärkte grüne Fluoreszenz in JGZ, in einigen Tubuli diffus, basolateral liegend (Tb), möglicherweise in Mitochondrien (\uparrow) (Braun et al., 2002) lokalisiert werden (Abb. 4.5; rechts oben und unten). Innerhalb des Glomerulums ziehen die fenestrierten Endothelzellen (\blacktriangleleft) als Kapillarschlingen deutlich markiert durch den Intrakapsulärraum der Bowmansche Kapsel. Die Rotfärbung mit dem Endothelmarker Anti-von Willebrand Faktor (Abb. 4.5, links oben) und die Kir6.1-Grünfärbung markieren jeweils die gleichen Strukturen (\blacktriangleleft).

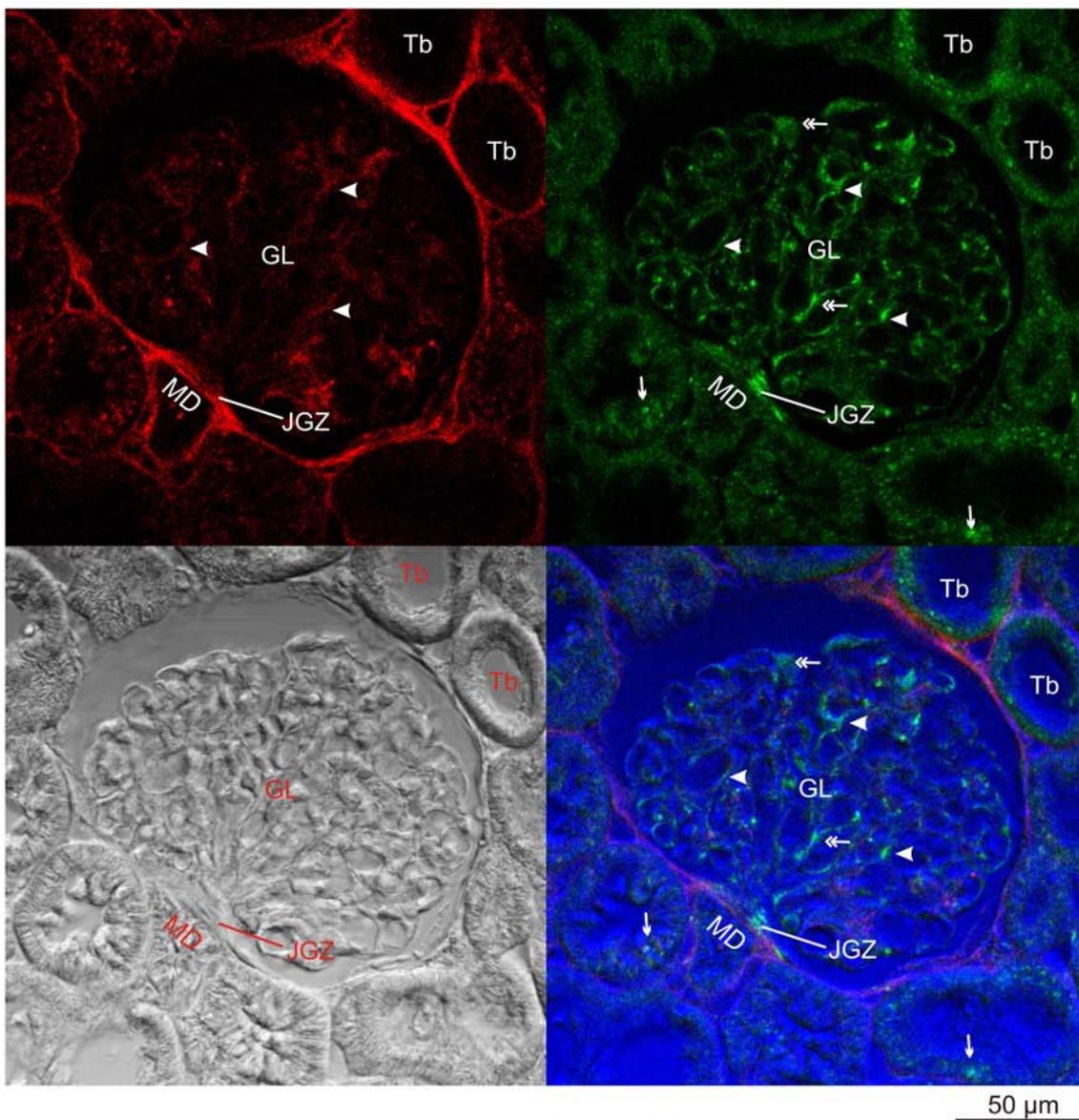


Abb. 4.5: Kir6.1 Kanäle in JGZ an Kryoschnitten von perfusionsfixierten Rattennieren. Dargestellt ist das konfokales Fluoreszenzbild mit "von Willebrand Faktor" in Kombination mit Cy5 IgG (li. oben-rot), das konfokales Fluoreszenzbild mit Kir6.1 AK in Kombination mit Alexa 488 IgG (re. oben-grün), das Durchlichtbild (li. unten) und das überlagerte Bild (Durchlicht- und konfokales Fluoreszenzbilder; re. unten-blau unterlegt). Die Grünfärbung zeigt die Lokalisation von Kir6.1 in JGZ im Bereich der aA und in Gefäßendothel (◄) des Glomerulums. Weitere diffuse Grünfärbungen weisen auf eine mögliche Lokalisation in Mesangialzellen (↑) sowie in Mitochondrien (↑) hin. Ebenso ist eine schwache basolateral liegende Färbung einzelner Tubuli zu erkennen (Tb). Die Schnitte von NaCl-arm ernährten Rattennieren wurden mit Kaninchen Anti-Kir6.1 AK und Maus Anti-von Willebrand Faktor gefärbt. Der Maßstab gibt 50 µm an. GL, Glomerulum; MD, Macula densa; JGZ, juxtaglomeruläre Zellen; Tb, Tubulus-basolateral.

Die Überlagerung der Doppelfärbung (◀) ist rechts unten zu sehen. Dies weist auf die Lokalisation von Kir6.1 in Endothelzellen hin. Da in einer Doppelfärbung mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin, u.a. als typischer Marker von Podozyten, kein Signal von Kir6.1 in Podozyten zu sehen ist (siehe Abb. 4.10A), ist die diffuse Grünfärbung zwischen den Kapillarendothelschlingen im Glomerulum sehr wahrscheinlich auf die Lokalisation von Kir6.1 in Mesangialzellen zurückzuführen. Eine Genexpression von Kir6.1 in Mesangialzellen wurde von Szamosfalvi et al., 2002 beschrieben.

Als eigentlicher Marker der Endothelzellen färbt der „von Willebrand Faktor“-AK in der Präparationstechnik mit perfusionsfixierten Nierenschnitten, nach Pfaff et al., 1999, zudem verstärkt Kollagenstrukturen an. Zu erkennen ist eine intensive Rotfärbung des parietalen Epithels der Bowman'schen Kapsel und der Tubuli (Bild oben links). Um die Spezifität des „von Willebrand Faktor“-AKs zu überprüfen, wurde die Präparationstechnik bei der Organentnahme von Niere und Gehirn der Ratte modifiziert (3.1.1.1). Die Doppelfärbung an Schnitten mit nicht perfusionsfixierten Nieren (Kloor et al., 2000) bestätigt die Koloakalisation von Kir6.1 und dem „von Willebrand Faktor“ im Glomerulum (Abb. 4.6). Im linken Bild kann der typische Verlauf des Kapillarendothels im Glomerulum als rot-grüne Doppelmarkierung (◀) mit dazwischen liegenden diffus grün-gefärbten Mesangialzellen verfolgt werden. Im Vergleich zu Kryoschnitten mit perfusionsfixierten Nieren (Abb. 4.5) wird der „von Willebrand Faktor“ aber weder in der Bowman'schen Kapsel noch in den Tubuli eindeutig detektiert. Er ist höchstens als schwache Färbung zu erahnen. Bei größeren Arterien hingegen bleibt die Affinität des „von Willebrand Faktor“-AKs zu Kollagenstrukturen erhalten (Abb. 4.6 rechts). Im Querschnitt durch eine größere Arterie (A. interlobularis) lässt sich der klassische Dreischichtenaufbau der Arterien erkennen, bestehend aus Tunica externa (adventitia), Tunica media und Tunica intima. Der „von Willebrand Faktor“-AK ist in Kollagenfasern der Tunica externa als stark gefärbter roter „Feuerring“ lokalisiert und in seiner Funktion als Endothelmarker in der Tunica intima ganz luminal gelegen. Durch eine Doppelmarkierung mit „von Willebrand Faktor“ kann Kir6.1 in glatten Muskelzellen der Tunica media und sehr wahrscheinlich in Endothelzellen (◀) lokalisiert werden.

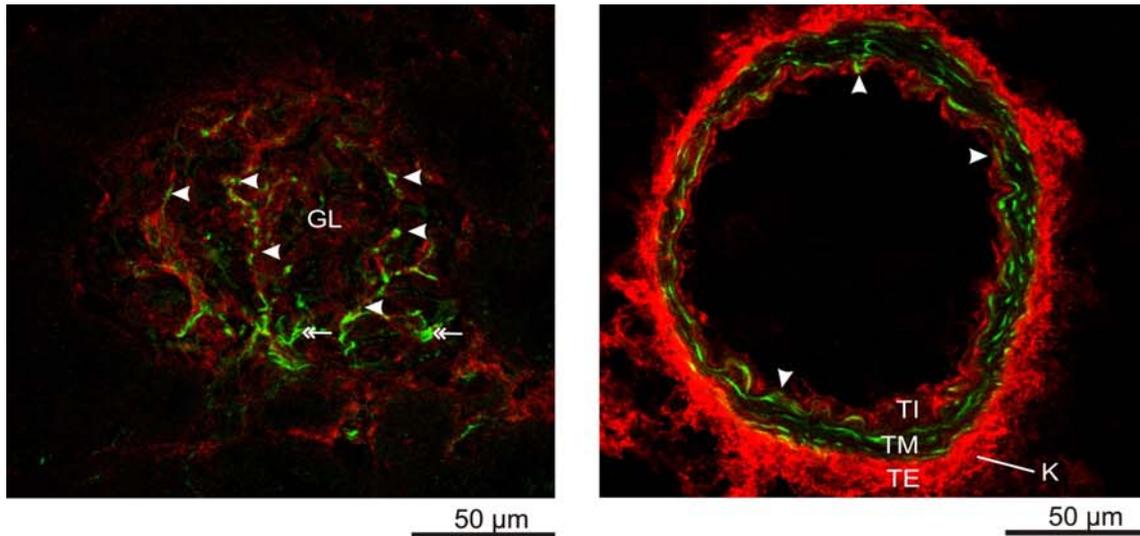


Abb. 4.6: "Von Willebrand Faktor" mit Kir6.1 in einem Glomerulum und in einer Arteria interlobularis an Schnitten mit nicht perfusionsfixierten Rattennieren.

Im linken Bild färbt "von Willebrand Faktor" (rot) in Kolokalisation mit Kir6.1 (grün) spezifisch das Kapillarendothel (◄) eines Glomerulums. Zusätzlich scheint Kir6.1 in Mesangialzellen lokalisiert zu sein (♣). In größeren arteriellen Gefäßen (rechts) markiert "von Willebrand Faktor" Endothel (◄) und Kollagen. Kir6.1 scheint glatte Muskelzellen der Tunica media und Endothel (◄) zu färben. Färbung mit Anti-von Willebrand Faktor und Anti-Kir6.1 Antikörper. Der Maßstab gibt 50 µm an. GL, Glomerulum; TM, Tunica media; K, Kollagenfasern.

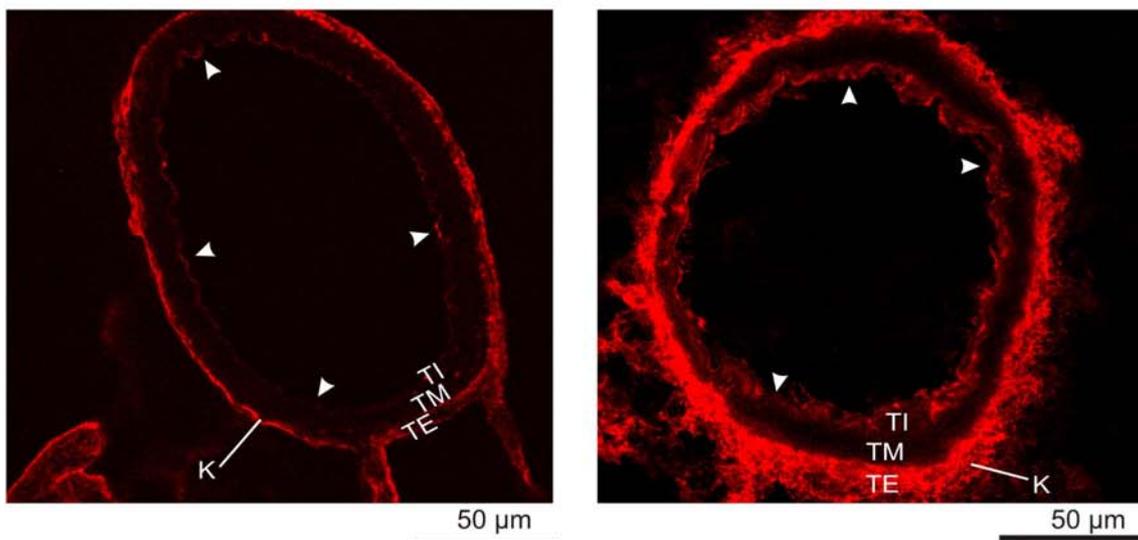


Abb. 4.7: Vergleich des "von Willebrand Faktors" in einer Arteria interlobularis an Schnitten mit perfusionsfixierten Nieren (links) mit nicht perfusionsfixierten Nieren der Ratte (rechts).

Intensität und Endothelmarkierung (◄) in nicht perfusionsfixierten Rattennieren ist stärker. Die Schnitte wurden mit Maus Anti-von Willebrand Faktor gefärbt. Der Maßstab gibt 50 µm an. TE, Tunica externa; TM, Tunica media; TI, Tunica intima; K, Kollagenfasern.

Ein Direktvergleich der beiden Präparationstechniken ist in Abb. 4.7 illustriert. Bei gleicher Konzentration des „von Willebrand Faktor“-AKs wird die deutlich signifikante Färbung des Endothels im rechten Kryoschnitt (nicht perfusionsfixierte Rattennieren) gegenüber dem linken Schnitt (perfusionsfixierte Nieren) sichtbar. In Schnitten mit perfusionsfixierten Nieren (links) färbt der „von Willebrand Faktor“-AK insgesamt schwächer, aber dennoch spezifisch Endothelzellen (◄) sowie verstärkt Kollagenfasern an.

Kir 2.1

Als starker Einwärtsgleichrichter ist Kir2.1 hauptverantwortlich für das Ruhemembranpotential von reninsezernierenden Zellen. Die Lokalisation von Kir2.1 in reninsezernierenden JGZ ist in Abbildung 4.8 durch eine signifikant grüne Fluoreszenz im distalen Anteil der afferenten Arteriole mit auswandernder Lokalisation in den JGA dargestellt (Detailansicht in Abb. 4.9A). Die Rotfärbung (Abb. 4.8, links oben) ist auf die Präparationstechnik mit perfusionsfixierten Nieren zurückzuführen. Spezifische Strukturen des Glomerulums konnten durch Doppelfärbung mit „von Willebrand Faktor“ als Endothelzellen (◄) der Kapillaren identifiziert werden. Eine Lokalisation in Podozyten kann mittels Doppelfärbungen mit Rhodamin-konjugiertem-Phalloidin ausgeschlossen werden (Abb. 4.11A). Weitere Grünfärbungen im Glomerulum scheinen folglich Mesangialzellen und vereinzelt Endothelzellen der Bowman'schen Kapsel zu lokalisieren. Die Intensität ist allerdings gering, vergleichend zur afferenten Arteriole, wo Kir2.1 stark exprimiert ist. Detailansichten in Abb. 4.9 zeigen, daß sich dieser Bereich mit der Lokalisation von reninsezernierenden Zellen deckt, die sich in der afferenten Arteriole befinden und teilweise weiter in den JGA erstrecken. Zusätzlich kann in beiden Abbildungen eine nach luminal verstärkte Fluoreszenz in umliegenden Tubuli und eine intrazelluläre „Tüpfelfluoreszenz“ entsprechend Kir6.1 (Abb. 4.5) gezeigt werden.

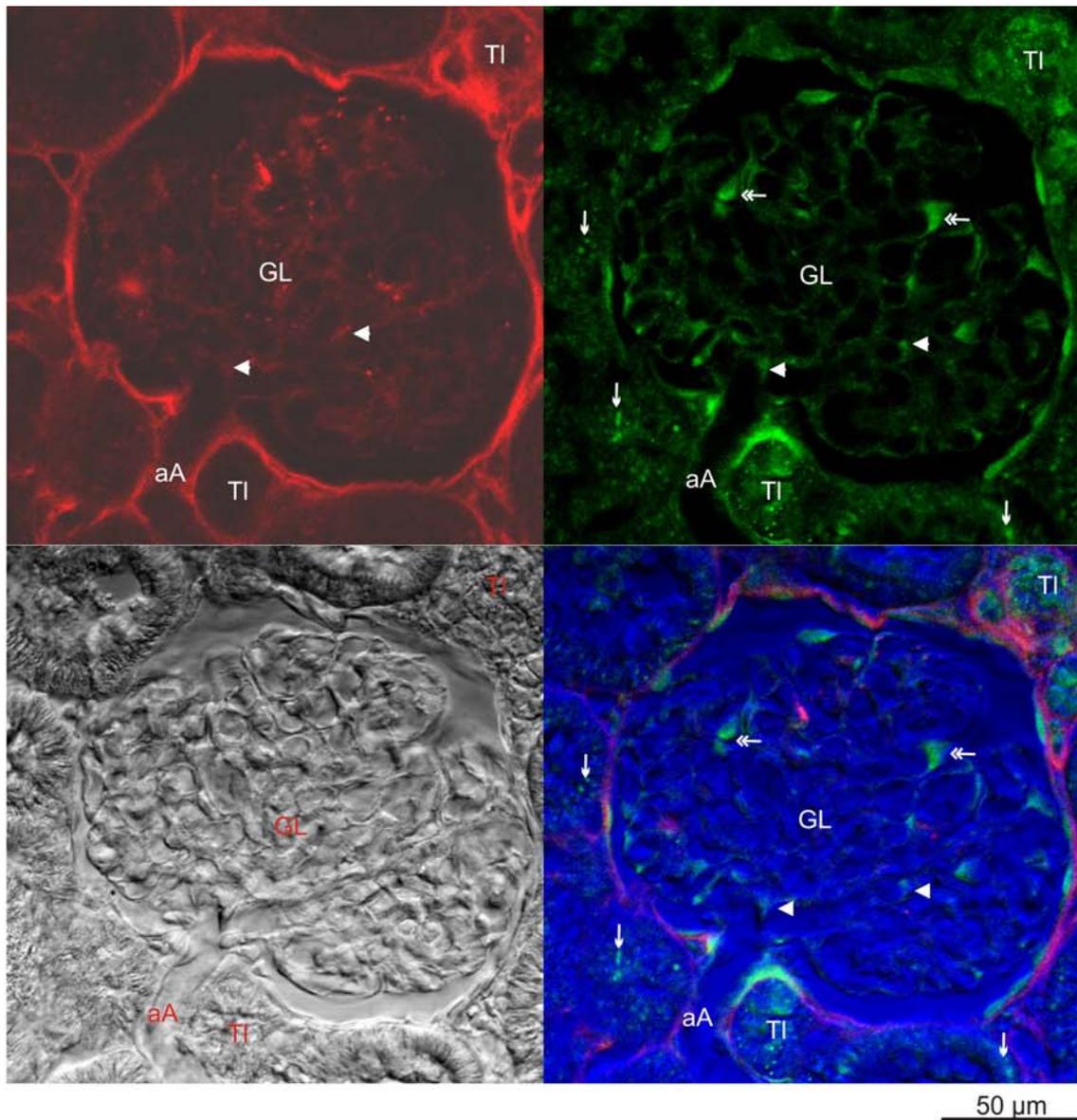


Abb. 4.8: Kir2.1 Kanäle in der aA der Rattenniere an Kryoschnitten von perfusionsfixierten Rattennieren.

Konfokales Fluoreszenzbild mit "von Willebrand Faktor" in Kombination mit Cy5 IgG (li. oben-rot), konfokales Fluoreszenzbild mit Kir2.1 Antikörper mit Alexa 488 IgG (re. oben-grün), Durchlichtbild (li. unten) und das überlagerte Bild (Durchlicht- und konfokale Fluoreszenzbilder; re. unten-blau unterlegt).

Dargestellt ist die afferente Arteriole mit Kir2.1 (grün) in der Niere von NaCl-arm ernährten Ratten. Kir2.1 scheint zudem in einigen Tubuli luminal, in Mitochondrien (†) und im Glomerulum in Endothelzellen (◄) sowie in Mesangialzellen (‡) lokalisiert zu sein. Der Maßstab gibt 50 µm an. Färbung mit Kaninchen Anti-Kir2.1 Antikörper und Maus Anti-von Willebrand Faktor. GL, Glomerulum; aA, afferente Arteriole; TI, Tubulus-luminal.

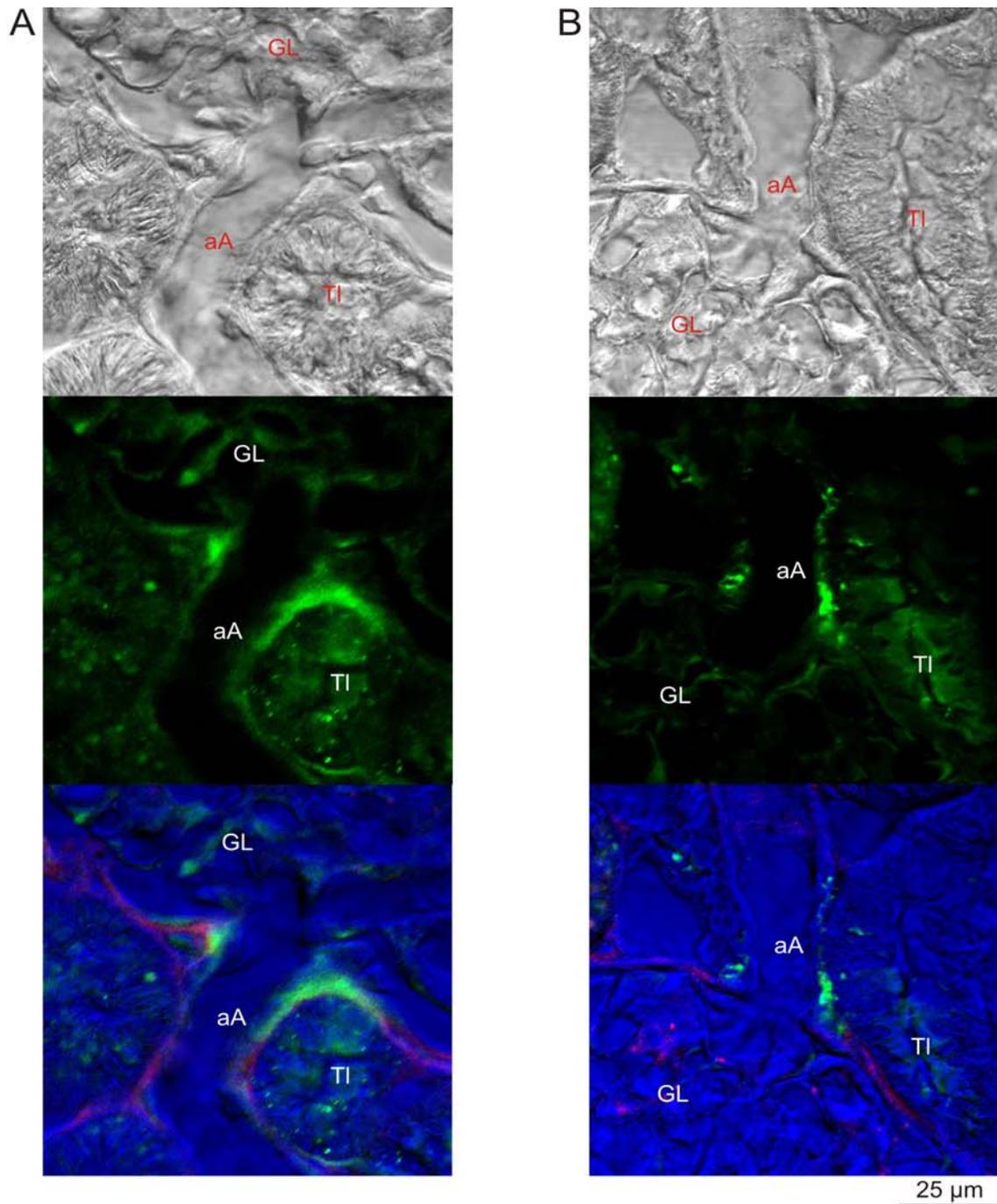


Abb. 4.9A und B: Kir2.1 Kanäle in der aA der Rattenniere.

Die aA, zweifach vergrößert, an ihrer Eintrittsstelle ins Glomerulum; (A) als Detailvergrößerung von Abb. 4.8 und (B) eine von oben kommende aA. Beide Bilder zeigen ein Durchlichtbild (oben) und Kir2.1 als grünes Fluoreszenzband entlang der aA sowie in einigen Tubuli luminal gelegen (mitte). Die unteren Bilder sind als Überlagerung der konfokalen Fluoreszenzbilder von Kir2.1 und "von Willebrand Faktor" (rot-färbt hier v.a Kollagen) mit blauem Durchlichtbild dargestellt. Doppelfärbung mit Kaninchen Anti-Kir2.1 Antikörper und Maus Anti-von Willebrand Faktor. Der Maßstab für Abb 4.9A und B gibt 25 µm an.
GL, Glomerulum; aA, afferente Arteriole; TI, Tubulus-luminal.

Kir2.2

Kir2.2 gehört zur Subfamilie der klassischen Kir-Kanäle. Mit seiner einwärtsgerichtenden Eigenschaft ist er für das Aufrechterhalten des Membranpotentials mitverantwortlich. Im Gegensatz zu Kir6.1 und Kir2.1 ist kein Signal der Immunfärbung in der Rattenniere zu erkennen. Die Funktionalität des Antikörpers konnte an Gehirnschnitten der Ratte bestätigt werden (Abb. 4.12g-i).

Kir2.3

Kir2.3 ist als Kanaluntereinheit eher unwahrscheinlich (Russ in Leichtle et al., 2004). Außerdem stand ein Antikörper während den Immunfärbungen nicht zur Verfügung. Ein Färbung wurde deshalb nicht durchgeführt.

4.1.1.2.2 Lokalisation der Kir-AK im Tubulus

Die unterschiedliche Lokalisation der Kir-Kanäle im Tubulus (Abb. 4.5, 4.8, und 4.9), läßt auf ein spezifisches Verteilungsmuster von Kir6.1 und Kir2.1 in verschiedenen Abschnitten des Tubulus und des Bürstensaums im Tubulus schließen. In Färbungen mit speziellen Markern einzelner Tubuliabschnitte kann dieses Verteilungsmuster im proximalen Tubulus und dem dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife dargestellt werden (Abb. 4.10 und 4.11).

Um die Expression von Kir6.1 und Kir2.1 im proximalen Tubulus der Ratte- niere zu charakterisieren, wurde Rhodamin-konjugiertes Phalloidin verwendet, das zusätzlich Aktinfilamente der Podozytenfußfortsätze markiert. Die Identi- fizierung im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife (TALH-thick ascending limb) erfolgte mit dem Anti-Tamm–Horsfall-Protein gearbeitet. Das Tamm- Horsfall Protein ist ein spezifischer Marker, der sich in der luminalen Membran des dicken aufsteigenden Asts der Henle Schleife befindet (Hoyer et al., 1979).

Kir 6.1

In Abbildung 4.10A ist Kir6.1 als schwache intrazelluläre Färbung zu erkennen, die sich diffus um die luminal-rote Rhodamin-konjugierte Phalloidinfärbung des proximalen Tubulus (◀) legt. Kir6.1 zeigt, entsprechend Abbildung 4.5, wieder die typisch punktförmige, diffus-grüne Immunfluoreszenz (Kanalfärbung; mitte). Im Gegensatz dazu ist Rhodamin-konjugiertes Phalloidin als signifikante Rotfärbung der luminalen Membran des proximalen Tubulus (Abb. 4.10A; unten) zu erkennen. Im Glomerulum stellt sich das Endothel als grün- schlängelnde Kanalfärbung dar. Eine Kolo-kalisation von Kir6.1 mit Aktinfilamenten der Podozytenfußfortsätzen (↑) läßt sich nicht erkennen.

Die Immunfärbung mit der Frage nach einer Lokalisation von Kir6.1 im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife (TALH) ist in Abbildung 4.10B dargestellt. Sie zeigt exemplarisch drei verschieden große Tubuli aus der Cortexregion der Niere, die im luminalen Bürstensaumanteil das „zahnradförmig-gestochene“ Anti-Tamm–Horsfall-Markerprotein des TALH (grün; unten) lokalisieren und von der roten Immunfluoreszenz des Kir6.1-Kanals umrahmt werden (◀).

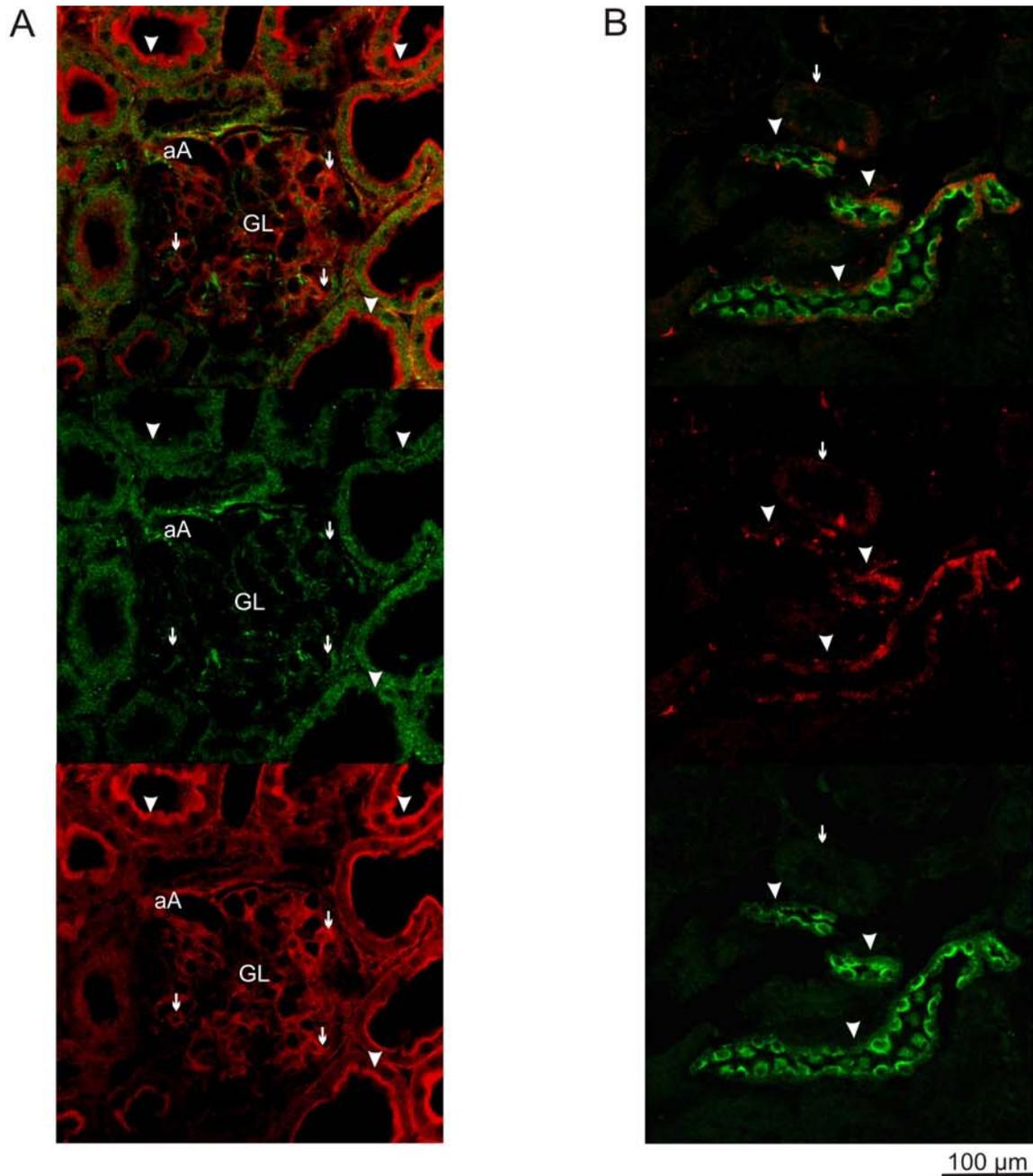


Abb. 4.10A und B: Immunlokalisation von Kir6.1 im proximalen Tubulus (A) und dem dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife im Cortex (B) der Rattenniere. (A) zeigt die immunopositive Doppelfärbung von Anti-Kir6.1 (grün-basolateral) mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin (rot-luminal) im Bürstensaum des proximalen Tubulus (◄). In Podozyten (†) zeigt Kir6.1 keine Lokalisation (B). Kir6.1 (rot-basolateral) mit dem Anti-Tamm-Horsfall Protein (grün) im TAL (◄) als markante Kolo-kalisation, sowie in nicht-markierten Tubuli (†). In (A) wurde Anti-Kir6.1 mit Alexa 488 IgG aus Ziege (grün) und Rhodamin-konjugiertem Phalloidin gefärbt. In (B) wurde Anti-Kir2.1 Antikörper mit CyTM5 Esel Anti-Kaninchen IgG (rot) konjugiert und Anti-Tamm-Horsfall-Protein mit AlexaTM488 Esel Anti-Ziege IgG (grün). Der Maßstab gibt 100 µm an. GL, Glomerulum; aA, afferente Arteriole.

Der Subtyp Kir6.1 bestätigt, trotz Rotfärbung, das typisch intrazelluläre, punktförmig-diffuse Färbemuster (Abb. 4.10B; mitte). Zusätzliche Kir6.1-gefärbte Tubuli (↑) wurden von dem Anti-Tamm–Horsfall-Proteins nicht markiert. Entsprechend Ergebnissen von Abbildung 4.10A und der Morphologie des hohen Bürstensaums handelt es sich dabei sehr wahrscheinlich um einen proximalen Tubulus.

Kir 2.1

Abb. 4.11A zeigt die Lokalisation von Kir2.1, entsprechend Kir 6.1, im proximalen Tubulus. Verglichen mit Kir6.1 lokalisiert sich Kir2.1 vorzugsweise im luminalen Anteil des Bürstensaums des proximalen Tubulus in Kolo-kalisation mit Rhodamin-konjugierten Phalloidin-färbung als grün-rot Überlagerung mit einer Farbtonveränderung ins Gelb-Orange imponiert (◀). Auch im Bürstensaum anderer, nicht Rhodamin-markierter Tubuli erscheint Kir2.1 als deutliche Grünfluoreszenz. Es handelt sich dabei entsprechend Vergleichsbildern der Lage und Morphologie höchstwahrscheinlich um den distalen Tubulus (siehe Abb. 4.8, 4.9). Die unter Kir2.1 erwähnte punktförmig-grüne intrazelluläre Färbung kann ebenfalls bestätigt werden. Keine Immunfluoreszenz von Kir2.1 zeigt sich in Podozyten (↑). Die Frage nach der Lokalisation im TALH wurde entsprechend Kir6.1 durchgeführt. Im Gegensatz zu Kir6.1 kann keine Kolo-kalisation von Kir2.1 mit dem Tamm–Horsfall-Protein im TALH detektiert (Abb. 4.10B) werden.

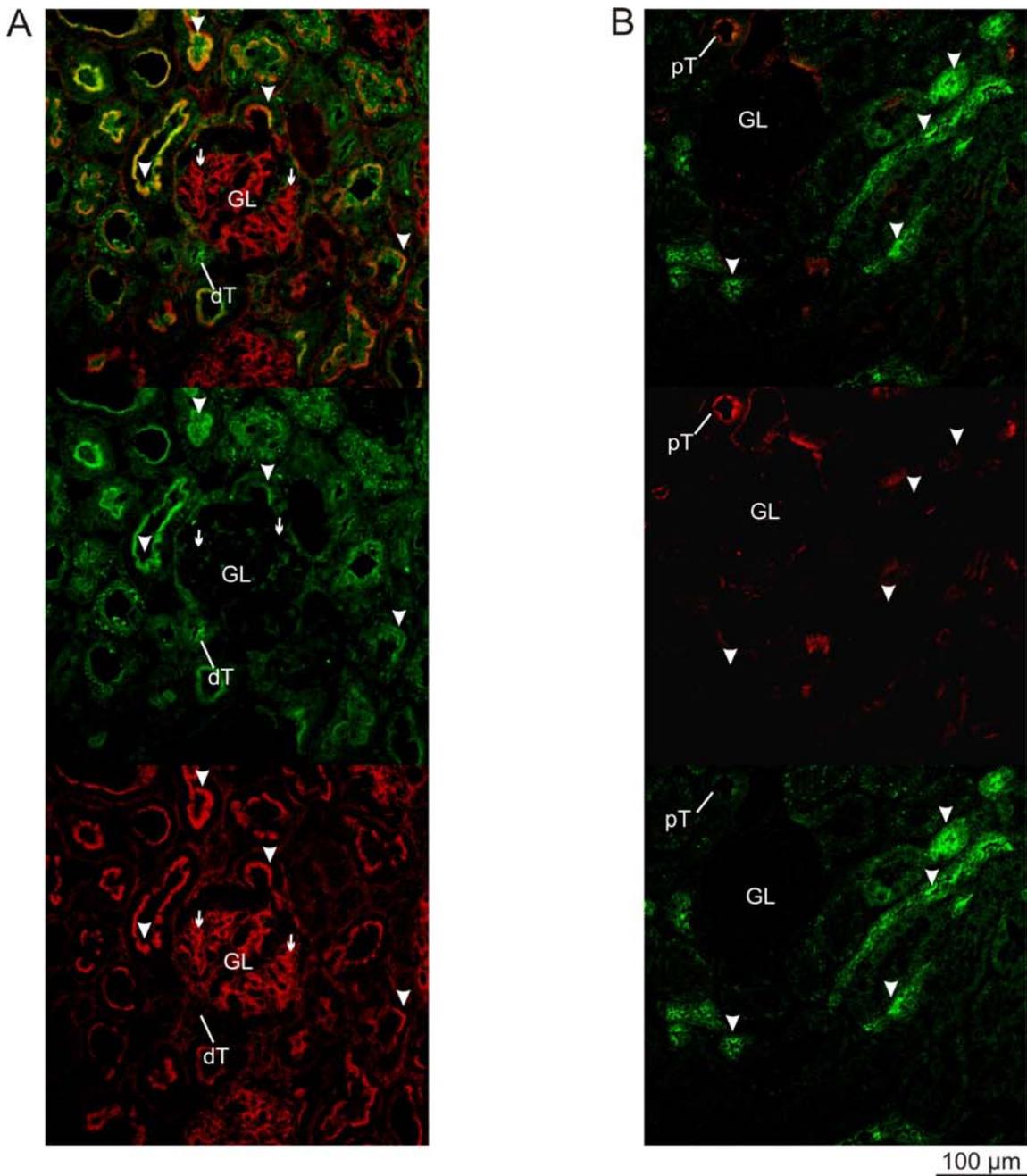


Abb. 4.11A und B: Immunlokalisation von Kir2.1 im proximalen Tubulus (A) und dem dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife im Cortex (B) der Rattenniere.

(A) zeigt die positive Doppelfärbung (◄) von Anti-Kir2.1 (grün) mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin (rot) im luminalen Anteil des Bürstensaums des proximalen Tubulus. Kir2.1 lokalisiert zudem den distalen Tubulus, nicht jedoch Podozyten (†). (B) Keine Lokalisation zeigt Kir2.1 (rot-luminal) im TAL (◄). In Bild A wurde Anti-Kir2.1 mit Alexa 488 IgG aus Ziege (grün) konjugiert. In B wurde Anti-Kir2.1 AK mit CyTM5 Esel Anti-Kaninchen IgG (rot) konjugiert und Anti-Tamm-Horsfall-Protein mit AlexaTM488 Esel Anti-Ziege IgG (grün). Der Maßstab gibt 100 µm an. GL, Glomerulum; dT, distaler Tubulus; pT, proximaler Tubulus.

4.1.1.3 Funktionskontrolle der Kir-AK im Gehirn der Ratte

An longitudinalen Gehirnschnitten der Ratte wurde die Funktionalität aller verwendeten Antikörper der Kir-Familie überprüft (Abb. 4.12) . Der zu untersuchende Kanal ist grün dargestellt (Alexa⁴⁸⁸ sekundärer AK). Zusätzlich wurde mit „von Willebrand Faktor“-AK (vWF, CyTM5 sekundärer AK, rot) gearbeitet.

Sowohl Kir6.1, als auch Kir2.2 konnten in Groß- und Kleinhirn signifikant lokalisiert werden. Kir2.1 ist als Färbung v.a. in Neuronen des Großhirns identifizierbar. Im Kleinhirn zeigt Kir2.1 diffuse bis keine Lokalisation.

Kir 6.1

Abbildung 4.12a-c zeigt die Lokalisation von Kir6.1 im Gehirn. In (a) ist der Bereich des 3. Ventrikels mit dem Plexus choroideus, dem Ort der Liquorbildung, im Großhirn dargestellt. Kir 6.1 exprimiert sich dort in den Ependymzellen, die die liquorhaltigen Hohlräume des ZNS auskleiden. Im Bereich des 3.Ventrikels kommen sie als spezialisierte Ependymzellen, den Tanyzyten vor, die über synaptische Verbindungen mit den Nervenzellen in Kontakt stehen und mit ihren langen Fortsätzen meist bis an Gefäße reichen (vereinzelt zu erkennen). Die Epithelzellen des Plexus choroideus hingegen zeigen keine Färbung des Kir6.1-AK. Der Plexus selbst ist als leuchtend rote Kettenform mit vWF markiert. Im Kleinhirn (b) ist Kir6.1 in der Bergmannschen Glia lokalisiert, die radspeicherartig zur gefäßreichen Hirnhaut (Pia Mater mit vWF randbildend rot dargestellt) zieht. Die Färbung von sternförmigen Astrozyten, sowohl in der Körnerschicht im Kleinhirn, als auch im Großhirn (c, 18 Vergrößerung), stellen ein Charakteristikum von Kir6.1 im Gehirn dar.

Kir 2.1

Die Lokalisation von Kir2.1 im Gehirn ist in Abb. 4.12d-f dargestellt. Im Seitenventrikel des Großhirns lokalisiert sich Kir2.1 im Ependym sowie im Plexusepithel des rot gefärbten Plexus choroideus (d). Teilweise scheint das Epithel an dieser Stelle in das Ependym überzugehen.

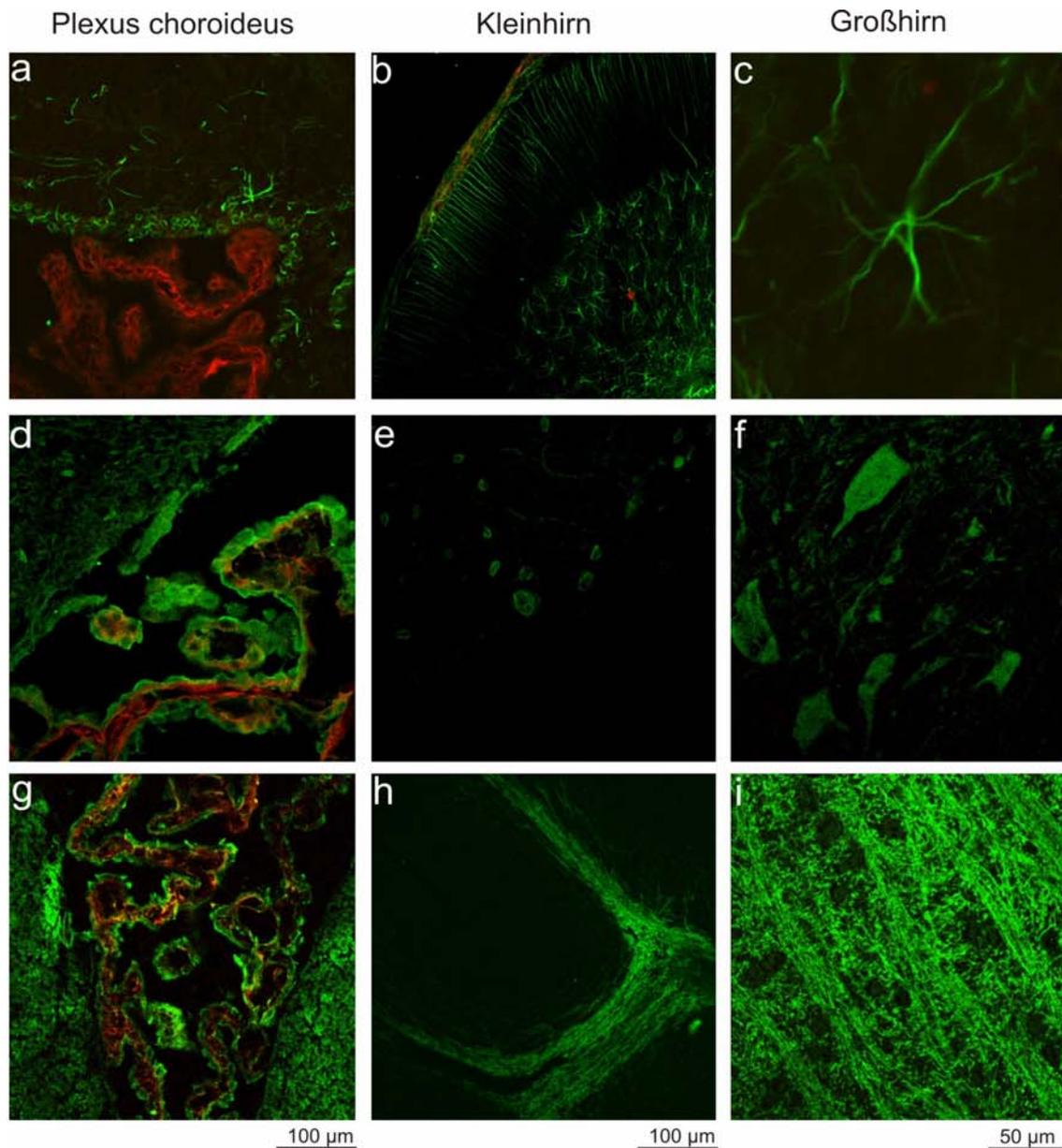


Abb. 4.12: Immunhistochemische Identifikation von Kir6.1 (a-c), Kir2.1 (d-f) und Kir2.2 (g-i) Kanäle im Gehirn der Ratte.

Kir6.1 zeigt Lokalisation in Tanyzyten des Plexus choroideus (rot) im 3.Ventrikel des Großhirns (a), in der Bergmann Glia des Kleinhirns (b) und in Astrozyten (b, c). Kir2.1 ist in Ependymzellen und dem Epithel des Plexus choroideus (rot) im Seitenventikel sowie Zellkörpern (a) lokalisiert, im Kleinhirn nur nuanciert im Purkinje-Nucleolus (b) und als charakteristische Färbung von Neuronen im Cortex des Großhirns (c) zu erkennen. Im Bereich des Seitenventrikels zeigt Kir2.2 (a) ein sehr ähnliches Färbemuster wie Kir2.1. Im Kleinhirn (b) und im Corpus callosum des Großhirns (c) setzt Kir2.2 markante Signale in Nervenfaserbündel. Alle Kryoschnitte wurden mit Kaninchen Anti-Kir Antikörper (grün) und dem Endothelmarker "von Willebrand Faktor" Maus Anti-körper (rot) doppelmarkiert.

Der Maßstab gibt 100 µm (a, b, d, e, g, h), 50 µm (f, i) und ~5 µm (c) an.

Einige Zellkörper, wahrscheinlich Neurone (Veh, persönliche Mitteilung), in den anliegenden Gehirnstrukturen des Seitenventrikels sind ebenfalls Kir2.1 positiv. Im Kleinhirn (e) ist lediglich eine sehr schwache, eher unspezifische Färbung der Nuklei von Purkinjezellen zu erahnen. Körnerschicht und restliche Strukturen im Kleinhirn sind nicht markiert. Die Spezifität der Kir2.1-Kanäle ist durch die positive Färbung von Neuronen mit ihrem Perikaryon (Zelleib) und Dendriten im Cortex des Großhirns (f) gekennzeichnet.

Kir 2.2

Die Funktionalität des Kir2.2-Antikörpers, der in der Niere keine Immunfärbung zeigt, konnte an Gehirnschnitten (Abb. 4.12g-i) der Ratte bestätigt werden. Kir2.2 zeigt, entsprechend Kir2.1, eine spezifische Lokalisation im Ependym und Plexusepithel des Seitenventrikels sowie in Nervenfaserbündel angrenzender Gehirnstrukturen (g). Der Plexus choroideus erscheint in Rot. Im Kleinhirn (h) stellen sich die Nervenfaserbündel als strukturbildende, prominente GÜnfärbung dar. Eine für Kir2.2 markante Struktur im Gehirn ist das Corpus callosum (i), der Balken zwischen beiden Großhirnhälften, der mit seinen dicken Fasersträngen eine wichtige Vernetzung der Hirnhälften darstellt.

Kir2.3

Eine Funktionskontrolle der Kir-AK im Gehirn der Ratte wurde entsprechend Kir2.3 an Kryoschnitten der Rattenniere (Kir2.3; S. 100) nicht durchgeführt.

4.1.1.4 Zusammenfassung der immunhistochemischen Lokalisation der Kir-Kanäle in Niere und Gehirn der Ratte

Zusammenfassend ist die Lokalisation der Kir-Kanäle Kir6.1, Kir2.1 und Kir2.2 mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern in Tabelle 1 dargestellt. Die einzelnen Kanäle wurden jeweils nach ihrer Lokalisation in Niere und Gehirn in positiv oder negativ eingeteilt und nach Zellausrichtung in den Tubuli luminal oder basolateral liegend beschrieben.

Tabelle 1: Expression der Kanäle Kir 6.1, Kir2.1 und Kir2.2 in Niere und Gehirn der Ratte

Lokalisation	KIR-KANÄLE		
	6.1	2.1	2.2
Niere			
Afferente Arteriole bzw. JGZ	+	+	-
Glomerulum			
Podozyten	-	-	-
Mesangialzellen	+	+	-
Endothelzellen	+	+	-
Tubuli			
Proximaler Tubulus	+(B)	+(L)	-
TALH	+(B)	-	-
Gehirn			
Großhirnhemisphären	+	+	+
Kleinhirn	+	-/+	+

- und + zeigen keine bzw. signifikante Färbung; -/+ unspezifische Färbung

L Lokalisation in luminaler Membran der Tubuli

B intrazelluläre Lokalisation, basolateral

TALH, thick ascending limb of Henle`s loop

KIR, (inwardly rectifying K⁺ channel) einwärtsgerichteter Kaliumkanal

4.1.2 Ergebnisse des Western Blots

Der Western Blot als proteinchemische Methode dient dem Nachweis des jeweiligen Kaliumkanal-Proteins. Dazu wurde eine Proteinextraktion aus Niere und Gehirn (3.1.1.1) durchgeführt und die Proteinkonzentration mit dem BIO-RAD Protein Assay nach Bradford ermittelt. Dies ermöglichte es, im Western Blot eine definierte Proteinmenge in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch zu trennen und auf eine PVDF- oder Nitrozellulosemembran zu transferieren. Nach dem Transfer (Blotten) erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern und die Detektion der Proteinbanden mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion (siehe Kapitel 3.1.2, Western Blot).

Zur Identifikation der spezifischen Kaliumkanäle der Rattenniere wurden Antikörper aus Kaninchen verwendet. Dabei zeigten die polyklonalen Kaninchen-Anti-Ratte IgG Antikörper (Veh, R; siehe 2.4) Kir2.2 und der als Serum vorliegende Kir 2.1 hohe Hintergrundreaktionen, die es schwierig machten, genaue Aussagen über die tatsächliche Reaktion zu treffen. Kir6.1-AK (Veh, R.) zeigte hingegen trotz hoher Hintergrundreaktion deutlich spezifische Banden auf. Die von der Firma Alomone verwendeten polyklonalen Kir2.1^a-AK Kaninchen-Anti-Ratte IgG (Keren-Raifman et al., 2000) und Kir2.3^a-AK Kaninchen-Anti-Mensch IgG (Falk et al., 1995) zeigten weniger unspezifische Hintergrundreaktionen. Hierbei ist auch zu beachten, daß in der Durchführung der Blots mit der Mikrokammer im Gegensatz zur großen Kammer die Hintergrundreaktion generell niedriger war, die Bandenexpression definierter und insgesamt bessere Ergebnisse für die Kir-Antikörper zeigte.

Die besten Ergebnisse wurden mit den polyklonalen Antikörpern gegen Kir6.1, Kir2.3^a-AK (jeweils 1:500) und Kir2.2, Kir2.1-AK (jeweils 1:250) in 10 ml 1 x PBS mit 0,05 % Tween 20 sowie 0,2 % Milchpulver in der Mikrokammer erzielt und werden in Abbildung 4.13 dargestellt.

Als Positivkontrolle diente der β -Actin-Antikörper (1:5000) in 10 ml 1 x PBS mit 0,05 % Tween 20 sowie 0,2 % Milchpulver.

^a Kir2.x-Antikörper der Firma Alomone in Jerusalem

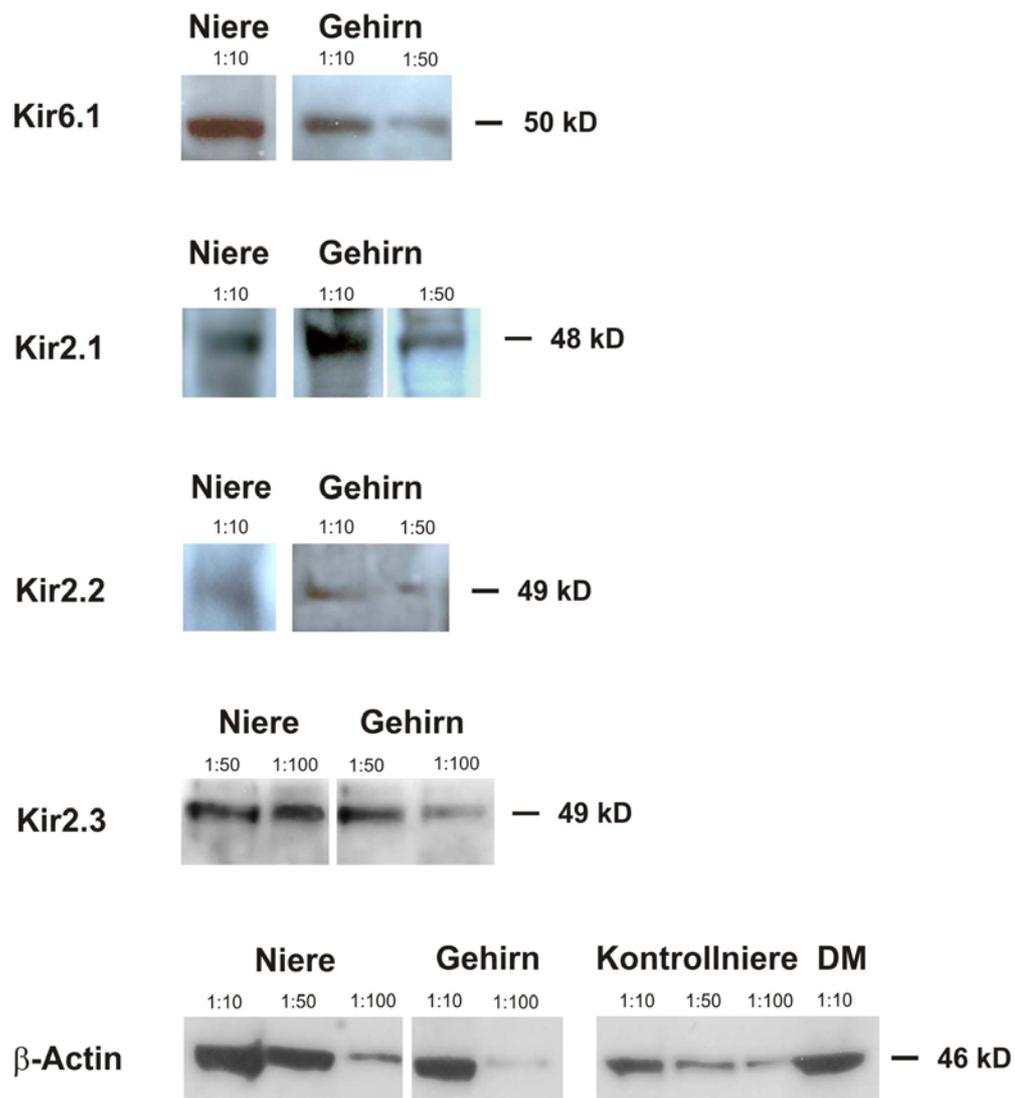


Abb. 4.13: Expression der Kaliumkanal-Proteine von Kir6.1, Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.3 in Niere und Gehirn der Ratte.

Die Proteine wurden auf einem 10 % SDS-Page getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Inkubation von 7,8-15,6-78 μ g (1:100-1:50-1:10) Protein von Niere und Gehirn einer NaCl-arm ernährten Ratte mit Kir6.1, Kir2.3^a-AK (je 1:500) und Kir2.2, Kir2.1^a-AK (je 1:250). Als Positivkontrolle wurde die Membran mit β -Actin-AK (1:5000) inkubiert und mit Protein einer un-behandelten Kontrollniere sowie mit einer an Diabetes mellitus erkrankten Rattenniere (DM) verglichen. Alle Kir-AK zeigen positive Banden in erwarteter Höhe.

^a Kir2.x- Antikörper der Firma Alomone in Jerusalem

Als Sekundärantikörper wurde AP-Ziege Anti-Kaninchen-AK (1:5000) und AP-Ziege Anti-Maus-AK (1:10000) ebenfalls in 10 ml 1 x PBS mit 0,05 % Tween 20 sowie 0,2 % Milchpulver eingesetzt.

Abbildung 4.13 zeigt die Inkubation von 7,8-15,6-78 µg (1:100, 1:50, 1:10) Protein aus Niere und Gehirn einer NaCl-arm ernährten Ratte mit Kir6.1, Kir2.3^a-AK (jeweils 1:500) und Kir2.2, Kir2.1^a -AK (jeweils 1:250). Die Proteine wurden auf einem 10 % SDS-Fertigel in der Mikrokammer getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

Kir6.1 zeigt sowohl in Niere als auch im Gehirn, trotz sonst relativ hoher Hintergrundsreaktion deutlich definierte Banden bei einer Höhe von 50 kD.

Kir2.1 (Serum) erlaubt aufgrund extrem hohen Hintergrundsreaktionen keine sichere Aussage über die tatsächliche Reaktion (nicht gezeigt). Die Untersuchung mit Kir2.1^a-AK zeigt hingegen eine signifikante Bandenexpression in Niere und Gehirn auf der Höhe von 48 kD.

Kir2.2 läßt trotz sehr starken Hintergrundreaktionen Banden auf der erwarteten Höhe von 49 kD in Nieren- und Gehirngewebe erkennen.

Kir2.3 zeigt deutliche Bandenexpression mit wenig Hintergrundreaktion bei 49 kD. Hier kann eine Zunahme der Bandenexpression mit steigender Proteinmenge beobachtet werden.

Die Positivkontrolle β -Actin zeigt eine Zunahme der Expressionsstärke der Banden in Abhängigkeit mit steigender Proteinmenge von Niere und Gehirn. Zusätzlich wurden die zu untersuchenden Nieren von NaCl-arm ernährten Ratten mit Kontrollnieren, die freundlicherweise von Dr. Harsch (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhards-Karls-Universität Tübingen; Abteilung Klinische Pharmakologie) bereitgestellt wurden, verglichen. Eine Kontrollniere stammte von einer unbehandelten Ratte (β -Actin: re. Gel, Banden von links: 1:10, 1:50, 1:100), die andere Kontrollniere von einer an Diabetes mellitus erkrankten Ratte (DM; 1:10). Dabei ist ebenso eine erhöhte Expression der Banden in Abhängigkeit mit steigender Proteinmenge der Kontrollnieren zu beobachten. Weiterhin zeigt die Expression in NaCl-arm ernährten und an Diabetes mellitus erkrankten Ratten im Gegensatz zu unbehandelten Ratten eine stärkere Bandenexpression.

4.1.2.1 Zusammenfassung der Nachweise der Kir-Kanäle in Niere und Gehirn der Ratte mittels Western Blot

Zusammenfassend kann die Expression der Kaliumkanal-Proteine von Kir6.1, Kir 2.1, Kir 2.2 und Kir2.3 in Niere und Gehirn der Ratte mittels Western Blot gezeigt werden. Durch die Verwendung der Antikörper Kir6.1, Kir2.1-Serum sowie Kir2.2 von Prof. Dr. Veh konnten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen für Kir6.1 und Kir2.1 direkt bestätigt und spezifiziert werden (Tabelle 2). Obwohl die Untersuchung mit Kir2.1-AK als Serum nur mit einer zu erahnenden Bande in erwarteter Höhe aufgrund der zu hohen Hintergrundreaktionen wenig aussagekräftig erscheint (nicht gezeigt), konnte eine weiterte Untersuchung mit Kir2.1^a-AK als polyklonalem IgG diese Expression von Kir2.1 bestätigen (Abb. 4.13). Kir2.2 zeigt eine positive, wenn auch relativ undefinierte, mit viel Hintergrundreaktion überlagerte Bandenexpression in der Niere (Abb. 4.13), die im Gegensatz zu negativen Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten der Rattenniere steht. Kir2.3 zeigt sowohl in der Niere als auch im Gehirn eine deutliche Expression der Proteinbanden.

Tabelle 2: Expression der Kaliumkanal-Proteine von Kir6.1, Kir 2.1, Kir2.2 und Kir2.3 in Niere und Gehirn der Ratte

Protein-Expression	KIR-KANÄLE			
	6.1	2.1	2.2	2.3
Niere	+	+	+/-	+
Gehirn	+	+	+/-	+

4.2 Molekularbiologische Nachweise auf RNA-Ebene

4.2.1 Ergebnisse der RT-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion nach cDNA-Synthese durch reverse Transkription)

Die Proteinnachweise der Kir-Subtypen mittels Immunhistologie und Western Blot wurden durch den molekularbiologischen Nachweis der mRNA-Expression mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR ergänzt.

Die aus Nieren- und Gehirngewebe sowie JGZ (Albinus et al., 1998) der Ratte isolierte Gesamt-RNA diente als Matrize zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription. Das cDNA-Produkt wurde in der PCR als Probe eingesetzt und ausgewählte Regionen der cDNA durch die Primer für Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3* (Bradley et al., 1999) amplifiziert. Die Amplikons der gewählten c-DNA-Regionen wurden mittels Gelelektrophorese detektiert und konnten als spezifische Bandenmuster in den folgenden Abbildungen (Abb. 4.15-4.19) identifiziert und quantifiziert werden. Dabei zeigte die RT-PCR zur Analyse von Gen-Transkripten von Kir2.x-Subtypen eine hohe Sensitivität und schnelle Ergebnisse.

4.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Der Erfolg jeder Gesamt-RNA Isolierung (siehe Kapitel 3.2.1.1) wird vor der Transkription durch photometrische Konzentrationsbestimmung und Berechnung des Quotienten E_{260}/E_{280} (E: Extinktion) überprüft. Der Wert von E_{260}/E_{280} lag bei weiterverwendeten Präparationen zwischen 1,79 und 2,0, so daß eine Verunreinigung durch Proteine, Salze oder Ethanol ausreichend gering war.

4.2.1.2 Optimierung der RT-PCR

Zur Optimierung der Methode wurden im RNA-Ansatz die Gesamt-RNA von Niere, Gehirn und JGZ sowie die $MgCl_2$ -Konzentrationen (1,5 mM-5,5 mM) für die Primer Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.3* (Bradley et al., 1999) variiert. Ebenso wurde ein Heißstart der PCR durchgeführt, welcher aber zu keiner Verbesserung führte.

Ein weiterer entscheidender Parameter für eine optimale PCR ist die Anzahl der Amplifikationszyklen. Bei der Optimierung der PCR wurde die Zyklenzahl von 32 auf 40 heraufgesetzt. Dabei zeigten Kir2.1 und Kir2.2 für JGZ, Niere und Gehirn ein optimales Expressionsmuster bei 32 Zyklen und Kir2.3* bei 35 Zyklen (nicht gezeigt). Aufgrund dieses Ergebnisses und um sicherzugehen, daß jedes verwendete Primer-Paar sein spezifisches Bandenmuster entwickeln konnte, wurde das endgültige PCR-Verfahren mit 32 Zyklen für Kir2.1 und Kir2.2 und mit 35 Zyklen für Kir2.3* durchgeführt (Abb. 4.15-4.19).

Die Anlagerungstemperatur („Annealing“-Temperatur) der Primer an die cDNA ist ausschlaggebend für die Spezifität der gesamten PCR. Deshalb wurde für jedes Primer-Paar Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.3* (Bradley et al., 1999) zusätzlich die optimale „Annealing“-Temperatur ermittelt.

Exemplarisch ist die Optimierung der RT-PCR für die Kir2.x-Subtypen in Abb. 4.14 dargestellt. Das Bandenmuster in Abb. 4.14 für Kir2.2 (A) und für Kir2.3* (B) ist zwischen den einzelnen Temperaturänderungen in der „Annealing“-Phase und den $MgCl_2$ -Konzentrationen je nach Primer weitgehend homogen. Das Optimum der amplifizierten PCR-Produkten für Kir2.2 aus Rattengehirn wurde bei einer „Annealing“-Temperatur von 57 °C mit einer $MgCl_2$ -Konzentration von 1,5 mM erreicht (A). Hinsichtlich der unterschiedlichen „Annealing“-Temperaturen und $MgCl_2$ -Konzentrationen war zu sehen, daß die Primer-Paare Kir2.2, entsprechend Kir2.1 (nicht gezeigt), bei niedrigeren „Annealing“-Temperaturen (55 °C, 56 °C) und $MgCl_2$ -Konzentrationen von 1,5-2 mM in ihrer Bandenexpression Ausfälle zeigen und bei höheren Temperaturen und einer 2,5 mM $MgCl_2$ -Konzentration meist nicht mehr in der Lage sind ihr spezifisches Bandenmuster zu erzeugen.

Das Ergebnis veranschaulicht, daß es unter nicht optimierten Bedingungen zu Ausfällen oder unspezifischen Bandenmustern verschiedener Primer kommen kann.

Die ermittelten optimierten Bedingungen des Rattengehirns wurden für die RT-PCR für Kir2.2 und Kir2.1 in JGZ, Niere und Gehirn sowie für die „single cell RT-PCR“ entsprechend übernommen (Abb. 4.15 -4.17).

In (B) ist das Optimum der amplifizierten PCR-Produkte für Kir2.3* im Rattengehirn bei einer „Annealing“-Temperatur von 60 °C und einer MgCl₂-Konzentration von 4,5 mM bei 32 Zyklen gezeigt. Höhere oder niedrigere (hier nicht gezeigt) MgCl₂-Konzentrationen, selbst bei optimierten „Annealing“-Temperaturen (58 °C, 59 °C, 60 °C), zeigen Abschwächungen bis Ausfälle der Bandenexpression.

Die unter diesen optimierten Bedingungen für RT-PCR aus Rattengehirn durchgeführte RT-PCR für Kir2.3* wurde danach in der Zyklenzahl auf 35 Zyklen erhöht, um zusätzlich eine optimale Bandenexpression für RT-PCR für Kir2.3* in Niere und JGZ der Ratte zu erhalten (Abb. 4.18).

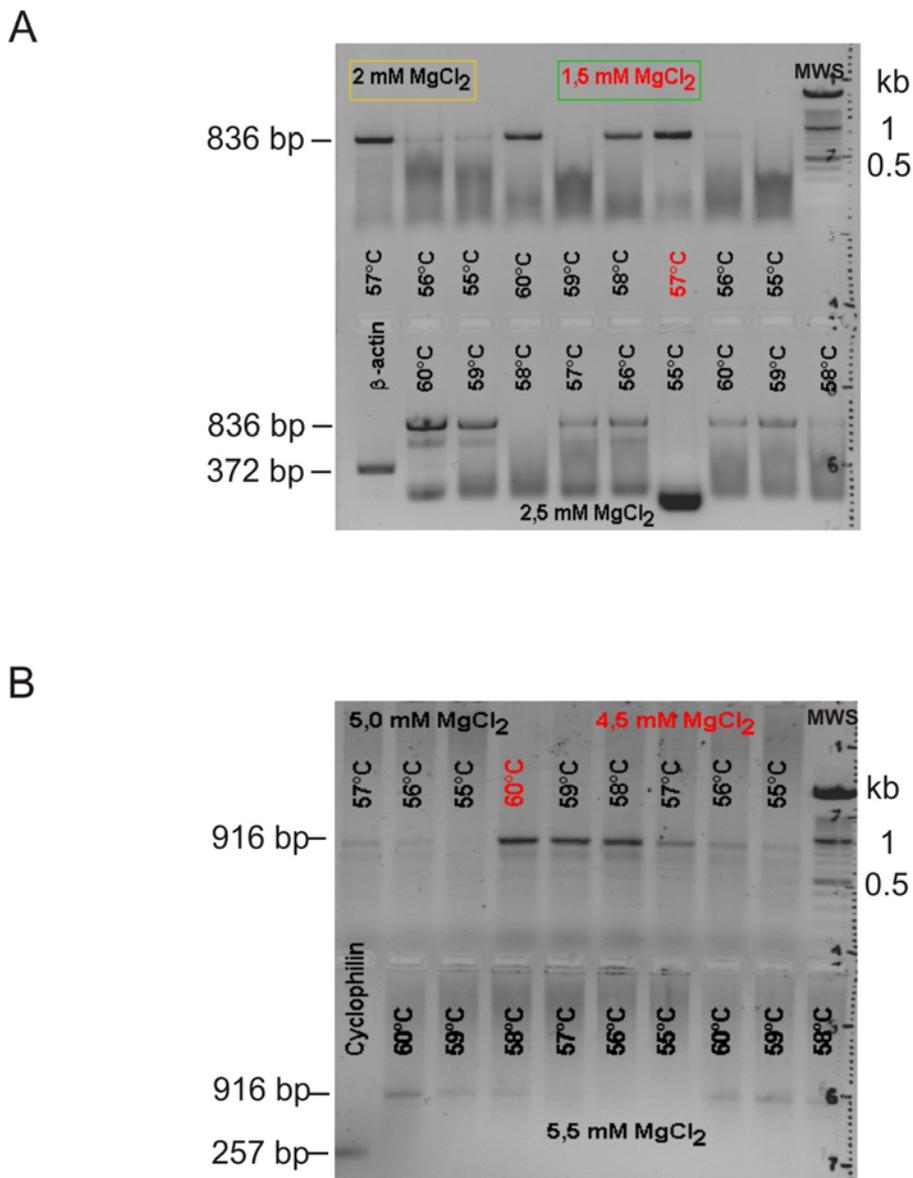


Abb. 4.14: Optimierung der RT-PCR für Kir2.2 und Kir2.3*.

Dargestellt sind zwei 1,5 % Agarosegele mit amplifizierten PCR-Produkten aus Rattengehirn (je 1 μ g Gesamt-RNA) für Kir2.2 (A) und Kir2.3* (B) bei 32 Zyklen mit „Annealing“-Temperaturen von 55-60 °C und MgCl₂-Konzentrationen von 1,5-5,5 mM sowie mit Molekulargewichtsstandard (MWS). (A) Das Optimum der amplifizierten PCR-Produkte für Kir2.2 (836 bp) aus Rattengehirn konnte bei einer „Annealing“-Temperatur von 57 °C mit einer MgCl₂-Konzentration von 1,5 mM bei 32 Zyklen ermittelt werden. Als „housekeeping“-Gen wurde β -Actin (372 bp) bei 57 °C und 1,5 mM MgCl₂-Konzentration verwendet. (B) Das Optimum der amplifizierten PCR-Produkte für Kir2.3* (916 bp) aus Rattengehirn wurde bei 60 °C „Annealing“-Temperatur und 4,5 mM MgCl₂ bei 32 Zyklen ermittelt. Als „housekeeping“-Gen wurde Cyclophilin (257 bp) bei 57 °C und 1,5 mM MgCl₂-Konzentration verwendet.

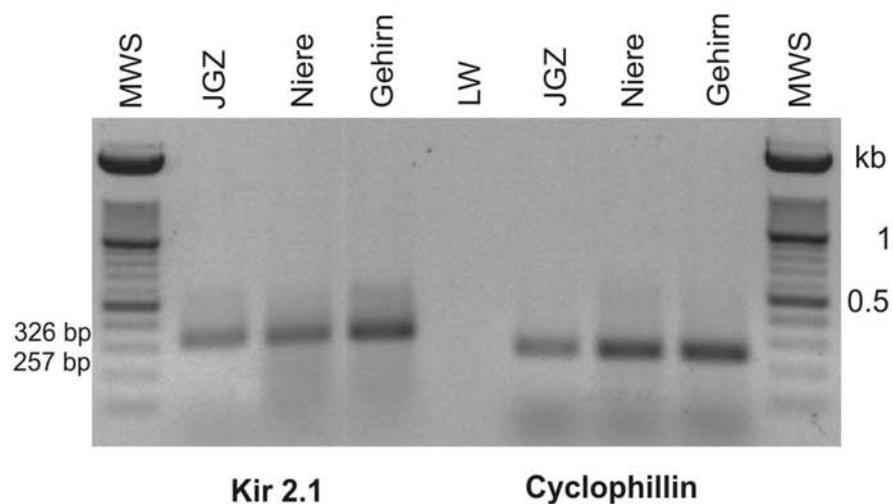
4.2.1.3 Genexpression der Kir2.x-Kanäle in JGZ, Niere und Gehirn der Ratte

Zum Nachweis der Genexpression der Kir2.x-Subtypen wurde die RT-PCR unter optimierten Bedingungen (siehe 4.2.1.2) angewandt. Die optimierte RT-PCR wurde mit Primern für Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.3* (Bradley et al., 1999) aus mRNA von JGZ, Nieren- und Gehirngewebe durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde in den gezeigten PCR-Amplifikationen Cyclophilin verwendet, das als ubiquitär exprimiertes zyklisches Polypeptid zur Überprüfung der Bedingungen der jeweiligen RT-PCR dient (3.2.1.3.1). Die gezeigten amplifizierten PCR-Produkte wurden in einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt und nach einer Laufzeit von 50-60 Minuten bei 100 Volt mit Hilfe von Ethidiumbromid und UV-Anregung digital photographiert. Anhand des Molekulargewichtstandards (MWS) konnte die Größe der PCR-Produkte identifiziert werden.

Kir2.1

Abbildung 4.15 zeigt eine deutliche Expression von Kir2.1-mRNA für JGZ, Nieren- und Gehirngewebe der Ratte. Die RT-PCR fand unter optimierten Bedingungen mit einer „Annealing“-Temperatur von 57 °C und einer MgCl₂-Konzentrationen von 1,5 mM bei 32 Zyklen statt. Im Gelbild (A) sind die Banden auf der zu erwarteten Höhe von Kir2.1 bei 326 bp und Cyclophilin bei 257 bp zu sehen. Die dargestellten spezifischen Banden sind in allen Amplikons homogen und zeigen in ihrer Bandenexpression keine Ausfälle. Der Leerwert (kein RNA-Einsatz) zeigt keine Verunreinigungen an, so daß keine Kontamination der Komponenten der RT-Reaktion stattfand und der Nachweis damit spezifisch ist. Im Vergleich des Expressionsniveaus eines Gens in verschiedenen Geweben und Zelltypen zeigt die Expressionsstärke gewisse Tendenzen auf. Die Gelbanden lassen eine Zunahme der absoluten Expressionsstärke von Kir2.1 mRNA in JGZ zur Rattenniere bis zum Rattengehirn erkennen was mittels semiquantitativer RT-PCR, als absolute Werte der integrierten optischen Dichte (ODI ; $ODI_{JGZ} < ODI_{Niere} < ODI_{Gehirn}$), bestätigt werden konnte.

A



B

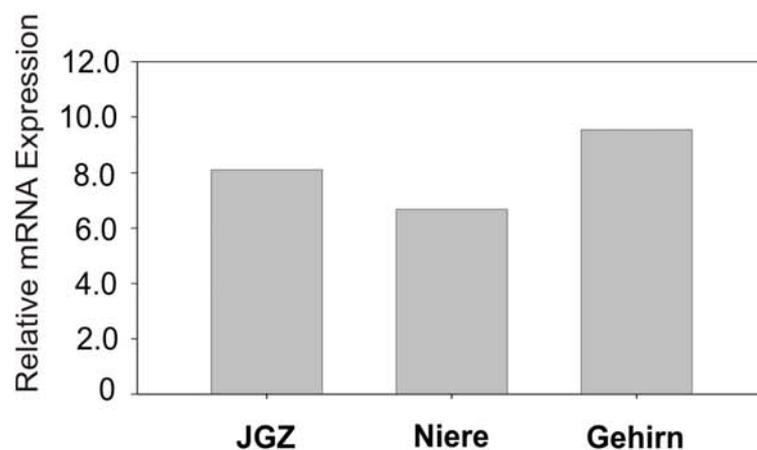


Abb. 4.15: Quantitative Expression von Kir2.1 in JGZ, Niere und Gehirn der Ratte.

(A) Exemplarisch dargestellt ist ein 1,5 % Agarosegel mit amplifizierten PCR-Produkten aus JGZ, Nieren- und Gehirngewebe der Ratte (je 1 µg Gesamt-RNA) für Kir2.1 bei 32 Zyklen mit MWS-Molekulargewichtsstandard und Leerwert (LW). Als Positivkontrolle wurde Cyclophilin verwendet. Deutliche Expression von Kir2.1 für JGZ, Nieren- und Gehirngewebe der Ratte in erwarteter Höhe bei 326 bp, Cyclophilin bei 259 bp, deren integrierte optische Dichte (ODI) ausgewertet wurde. (B) Die mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR ermittelten Werte für die relative mRNA Expression von Kir2.1 des oben gezeigten Gels sind in einem Balkendiagramm dargestellt. Dazu wurde der Quotient ODI Kir2.1/Cyclophilin für jede Probe berechnet und mit dem Mittelwert multipliziert. Unterschiede in der Expression können daraus nicht abgelesen werden.

Cyclophilin zeigt in der Niere eine leicht niedrigere bis gleiche ODI wie das Gehirn, im Vergleich zu einer kleineren ODI in den JGZ, was auch an der Bandenstärke in (A) zu erkennen ist.

Die semiquantitative Auswertung für die relative mRNA Expression in der jeweiligen Probe wird als Quotient von Kir2.1-mRNA und der mRNA von Cyclophilin für jedes Experiment berechnet und mit den Ergebnissen des Mittelwerts multipliziert (3.2.1.7.1). Die entsprechend ermittelten Werte für die relative mRNA Expression in der jeweiligen Probe sind in Abb. 4.15 (B) als Balkendiagramm aufgetragen. Das hier gezeigte Diagramm darf aber nicht überbewertet werden, da es nur von einer Probenaufbereitung des oben gezeigten Gels stammt. Rückschlüsse auf Unterschiede in der RNA-Expression können daher nicht abgelesen werden.

Die Expression von Kir2.1 in den JGZ stellte die Voraussetzung für die Untersuchung der Expression in einzelnen isolierten JGZ („single cells“) dar. Zwei einzelne JGZ, deren Isolation durch Laser capturing erfolgte, wurden auf die mRNA Expression von Kir2.1 und Renin mittels RT-PCR unter optimierten Bedingungen (siehe 4.2.1.2) untersucht (durchgeführt von Dr. Benöhr). In Abb. 4.16 ist die „single cell“ RT-PCR für Kir2.1 in JGZ dargestellt. Beide Zellen zeigen eine schwache, aber positive mRNA Expression für Renin und in einer Zelle kann zudem Kir2.1 als schwach positive Expression gezeigt werden.

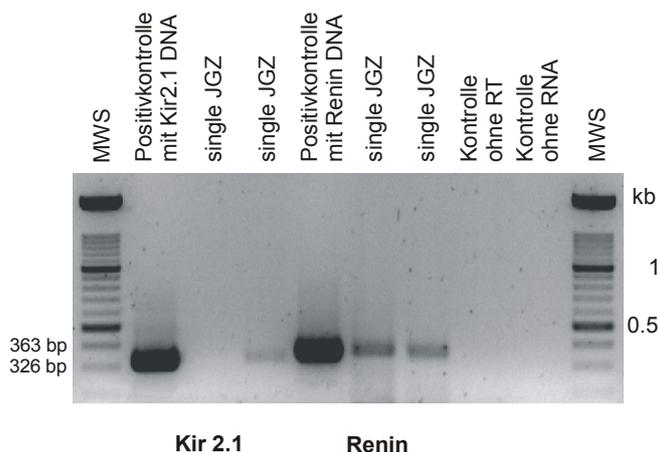


Abb. 4.16: Single cell RT-PCR für Kir2.1 in JGZ der Ratte.

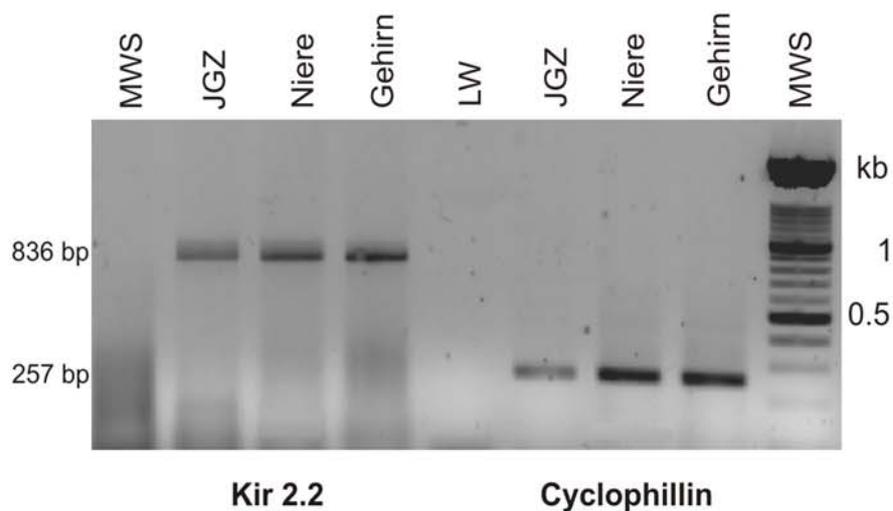
Dargestellt ist ein 1,5 % Agarosegel mit amplifizierten PCR-Produkten aus einzel isolierten JGZ der Ratte für Kir2.1 und Renin bei 32 Zyklen mit Molekulargewichtsstandard (MWS), Positivkontrollen aus Rattengehirn und Negativkontrollen, ohne RT und RNA. In zwei single JGZ zeigt die mRNA von Renin ein deutliches Signal bei 363 bp, in einer der zwei single JGZ ist zudem eine positive Expression der mRNA für Kir2.1 in erwarteter Höhe bei 326 bp zu sehen.

Kir2.2

In Abbildung 4.17 ist die quantitative Expression von Kir2.2 mRNA für JGZ, Nieren- und Gehirngewebe der Ratte dargestellt. Die optimierte RT-PCR fand mit einer „Annealing“-Temperatur von 57 °C und einer MgCl₂-Konzentration von 1,5 mM bei 32 Zyklen statt und zeigt keine Verunreinigungen an (Leerwert). Das Bandenmuster (A) für Kir2.2 liegt auf der zu erwarteten Höhe bei 836 bp, das „housekeeping“-Gen Cyclophilin bei 259 bp.

Wieder nimmt die Expressionsstärke der Banden, entsprechend Kir2.1, in JGZ von Rattenniere bis zum Rattengehirn zu (semiquantitative RT-PCR: $ODI_{JGZ} < ODI_{Niere} < ODI_{Gehirn}$). Für Cyclophilin konnte eine annähernd gleich bis leicht höhere ODI für die Niere gegenüber dem Gehirn und eine deutlich geringere ODI in JGZ beobachtet werden; zu sehen an der Bandenstärke in (A). Die semiquantitative Auswertung für die relative mRNA Expression in der jeweiligen Probe ist als Balkendiagramm in (B) veranschaulicht. Ein Vergleich oder Unterschied der relativen mRNA Expression kann anhand von nur einem Gel auch hier, entsprechend Kir2.1, nicht abgelesen werden.

A



B

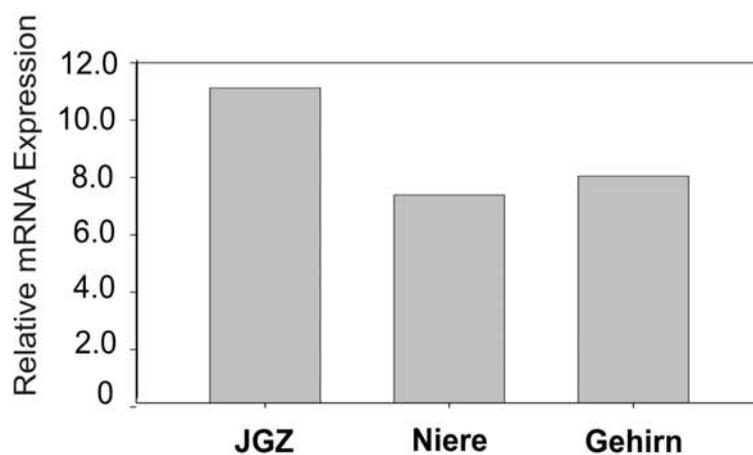


Abb. 4.17: Quatitative Expression von Kir2.2 in JGZ, Niere und Gehirn der Ratte.

(A) Exemplarisch dargestellt ist ein 1,5 % Agarosegel mit amplifizierten PCR-Produkten aus JGZ, Nieren- und Gehirngewebe der Ratte (je 1 µg Gesamt-RNA) für Kir2.2 bei 32 Zyklen mit Molekulargewichtsstandard (MWS) und Leerwert (LW). Als „housekeeping“-Gen wurde Cyclophilin verwendet. Kir2.2 zeigt eine deutliche Expression in JGZ, Nieren- und Gehirngewebe der Ratte in erwarteter Höhe bei 836 bp, Cyclophilin bei 259 bp. Das Balkendiagramm (B) stellt die relative mRNA Expression von Kir2.2 des oben gezeigten Gels in JGZ, Nieren- und Gehirngewebe mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR dar. Unterschiede können daraus aber nicht abgelesen werden.

Kir2.3*

Aufgrund der Primersequenz von Kir2.3* aus Maus nach Bradley et al., 1999 und Neuanalysen, die eine schlechte Übereinstimmung mit der Kir2.3 Primersequenz der Ratte ergaben (siehe 2.5), sind diese Ergebnisse gesondert und mit diesem Hintergrundwissen zu betrachten.

Die in Abb. 4.18 dargestellte Expression von Kir2.3* mRNA für JGZ, Nieren- und Gehirngewebe der Ratte fand bei optimierten Bedingungen für die RT-PCR, einer „Annealing“-Temperatur von 60 °C und einer MgCl₂-Konzentrationen von 4,5 mM bei 35 Zyklen statt. Cyclophilin erscheint erwartungsgemäß bei 259 bp. Die Genexpression für Kir2.3* zeigt in ihrem Bandenmuster Unterschiede auf sowie unspezifisch schwach markierte Banden. Die Bandenexpression selbst zeigt jedoch keine Ausfälle. Die stärkste Bande erscheint in allen Proben auf einer Höhe von 916 bp. Die semiquantitative Auswertung für die relative mRNA Expression in der jeweiligen Probe wurde aufgrund der fehlerhaften Übereinstimmung der Kir2.3* Sequenz aus der Maus mit der Kir2.3 Sequenz aus der Ratte nicht durchgeführt.

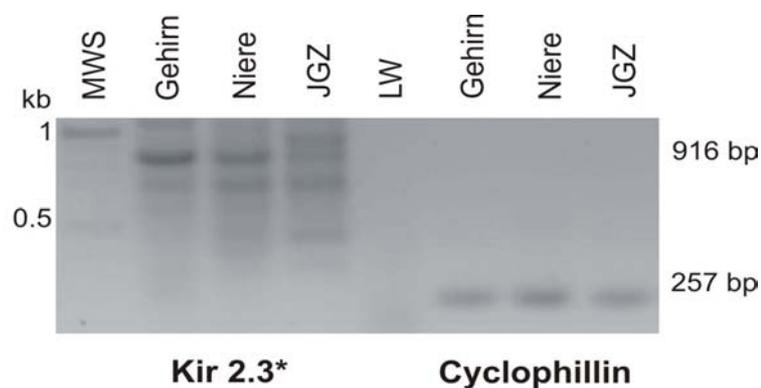


Abb. 4.18: Expression von Kir2.3* in JGZ, Niere und Gehirn der Ratte.

Dargestellt ist ein 1,5 % Agarosegel mit amplifizierten PCR-Produkten aus JGZ, Niere und Gehirn der Ratte (je 1 µg Gesamt-RNA) für Kir2.3* bei 35 Zyklen mit Molekulargewichtsstandard (MWS) und Leerwert (LW). Als „housekeeping“-Gen wurde Cyclophilin verwendet. Die Expression von Kir2.3* mit Primer designed für Maus zeigt für JGZ, Niere und Gehirn der Ratte ein unspezifisches Bandenmuster mit stärkster Bande bei 916 bp. Aufgrund der schlechten Übereinstimmung der Primersequenz von Kir2.3* aus Maus mit Kir2.3 aus Ratte (siehe 2.5) läßt das Ergebnis keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Genexpression von Kir2.3 in der Ratte zu.

4.2.1.4 Zusammenfassung der mRNA Expression der Kir2.x-Kanäle in JGZ, Niere und Gehirn der Ratte

In Tabelle 3 ist der Nachweis der mRNA Expression von Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.3* zusammengefaßt.

Tabelle 3: Expression der mRNA von Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.3* in JGZ, Niere und Gehirn der Ratte

mRNA Expression	KIR-KANÄLE		
	2.1	2.2	2.3*
JGZ	+	+	(+)
Niere	+	+	(+)
Gehirn	+	+	(+)

In Tabelle 3 sind die einzelnen Kanäle jeweils nach ihrer Genexpression eingeteilt. Sowohl für Kir2.1 als auch für Kir2.2 konnte die molekularbiologische Charakterisierung auf Genebene in JGZ, Nieren- und Gehirngewebe der Ratte eindeutig als positiv nachgewiesen werden.

Für Kir2.3* kann ebenfalls eine in allen Experimenten positive Expression festgestellt werden, wobei die Expression erst nach 35 Zyklen erfolgte und ein unklares Bandenmuster ergab. Aufgrund der schlechten Übereinstimmung mit Kir2.3 aus Ratte (siehe 2.5) können jedoch keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Genexpression des Kanals gezogen werden.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Charakterisierung von Kir6.1 und der Kir2.x-Subtypen auf Protein- und RNA-Ebene ergeben ein umfassendes Expressionsprofil für jeden untersuchten Kanal, wobei das besondere Interesse der afferenten Arteriole der Rattenniere mit den JGZ gilt. Untersuchungen im Gehirn dienen als Positivkontrolle.

Die Zusammenfassung der einzelnen Ergebnisse ist nach Methode geordnet hinter den entsprechenden Ergebnissen in Tabellenform aufgeführt: Tabelle 1 (S.109): Immunfluoreszenzfärbung, Tabelle 2 (S.113): Western Blot und Tabelle 3 (S.124): PCR.

Kir6.1 zeigt in Fluoreszenzfärbungen eine deutliche Lokalisation im Bereich der afferenten Arteriole (nicht gezeigt) bzw in den JGZ (Abb. 4.5) der Rattenniere. Im Glomerulum ist Kir6.1 im Endothel und sehr wahrscheinlich in Mesangialzellen, nicht aber in Podozyten lokalisiert. Desweiteren ist eine basolaterale, intrazelluläre Lokalisation im proximalen Tubulus und dem TALH (Abb. 4.10A und B), möglicherweise in Mitochondrien vorhanden (4.1.1.4; Tab. 1). Das Vorkommen des Proteins in der Niere und die Spezifität des AKs konnte im Western Blot (Abb. 4.13) bestätigt werden.

Kir2.1 wurde entlang der afferenten Arteriole der Rattenniere nachgewiesen (Abb. 4.8 und Abb. 4.9). Zudem kommt Kir2.1 im Glomerulum in Endothelzellen, möglicherweise in Mesangialzellen, nicht aber in Podozyten vor. Im proximalen Tubulus kann Kir2.1 deutlich luminal gezeigt werden (Abb. 4.11A und B). Keine Lokalisation von Kir2.1 findet sich jedoch im TALH (4.1.1.4; Tab. 1). Im Western Blot kann eine Bandenexpression in der Niere nachgewiesen werden (Abb. 4.13). Die Expression von Kir2.1 in den JGZ und der Niere lässt sich durch mRNA-Nachweis mittels semiquantitativer PCR erhärten (Abb. 4.15). Auch in einzelnen isolierten JGZ konnte eine mRNA-Expression von Kir2.1 detektiert werden (Abb. 4.16).

Kir2.2 ist in Immunfärbungen der Rattenniere nicht zu detektieren, im Gegensatz zu Kir6.1 und Kir2.1. Im Gehirn hingegen ist eine signifikante Lokalisation möglich (Abb. 4.12g-i). Im Western Blot kann die Expression des

Kanalproteins in der Niere als schwache Bande mit viel Hintergrundreaktion nachgewiesen werden (Abb. 4.13). Auf RNA-Ebene zeigt Kir2.2 eine deutliche Expression in den JGZ und der Niere (Abb. 4.17).

Kir2.3 wurde im Western Blot und mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR untersucht. Aufgrund einer schlechten Übereinstimmung der verwendeten Primersequenz aus der Maus (Bradley et al., 1999) mit dem Kir2.3 Primer aus der Ratte (2.5) sind die Ergebnisse der RT-PCR gesondert zu betrachten. Der Nachweis auf Proteinebene mittels Western Blotting in der Niere ist jedoch deutlich positiv (Abb. 4.13).

5 DISKUSSION

Reninsezernierende Zellen sind nicht nur in der Niere lokalisiert, wo sie als erstes entdeckt wurden, sondern auch in verschiedenen anderen Organen, wie dem Gehirn, der Hypophyse, dem Herzen, den Hoden, den Nebennieren und den Gefäßmyozyten der Arterien (Hackenthal et al., 1990). In der Niere nehmen die reninsezernierenden Zellen des juxtaglomerulären Apparates (JGZ) jedoch in ihrer Funktion als Hauptquelle des Renins eine elementare Rolle ein. Überwiegend in der Media der afferenten Arteriole lokalisiert, kann sich der reninpositive Anteil des Gefäßes je nach physiologischem Zustand des Tieres weiter nach proximal erstrecken (Taugner et al., 1982; Bührle et al., 1984). Reninsezernierende Zellen können sich in glatte Muskelzellen umwandeln und *vice versa* (Cantin et al., 1977; Sequeira Lopez et al., 2001), denen sie auch in vielen Eigenschaften ähneln. Dies ist insofern interessant, da die glatte Muskulatur der Gefäße für die Autoregulation der Durchblutung in Niere und im Glomerulum verantwortlich ist.

Die Existenz von K_{ATP} -Kanälen in diesen Zellen wurde funktionell durch mehrere Publikationen wahrscheinlich gemacht (Richer et al., 1990; Ferrier et al., 1989; Linseman et al., 1995; Vallon et al., 1998; Jensen et al., 1998). Der elektrophysiologische Nachweis und ihre Eigenschaften wurden durch Strom- und Spannungsmessungen genauer charakterisiert (Russ et al., 1999).

In wegbahnenden Strom- und Spannungsmessungen konnte in JGZ zudem ein starker einwärtsgerichteter Kaliumstrom nachgewiesen werden (Kurtz und Penner, 1989). Diesem charakteristischen Strom wurde in der afferenten Arteriole der Rattenniere eine wichtige funktionelle Rolle für die Lage des Ruhemembranpotentials und den Ruhetonus zugeschrieben (Chilton und Loutzenhiser, 2001). Eine detailliertere elektrophysiologische und molekularbiologische Charakterisierung dieser Kanäle war bisher nicht bekannt.

Um der Charakterisierung von Kir6.1 und der Kir2.x-Subtypen in JGZ der Rattenniere ein möglichst aussagekräftiges und spezifisches Expressionsprofil zu verleihen, wurden die Kir-Subtypen auf Proteinebene mittels Immunhistofärbungen, Western Blotting sowie auf RNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht.

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Immunhistochemischer Nachweis

Die genaue Lokalisation einwärtsgerichteter Kaliumkanäle in reninsezierenden Zellen erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten der Rattenniere.

In Vorversuchen mit dem Adenosin-A1-Rezeptor-AK konnte die Funktionalität der Methode bestätigt werden. Der A1-Rezeptor ist erwartungsgemäß im Bereich der afferenten Arteriole der Rattenniere lokalisiert (Abb. 4.2), was in Übereinstimmung mit Kryoschnittfärbungen von Rauch (unveröffentlichte Befunde) und der Immunzytochemie von Smith et al., 2001 steht. Das Vorkommen als Subtyp der membranständigen Adenosinrezeptoren in JGZ (Weaver und Reppert, 1992) wurde zudem an Färbung dieser Zellen untersucht (Abb. 4.3). Die Spezifität der Methode und des Adenosin-A1-AKs wird durch den positiven Nachweis des A1-Rezeptors in isolierten JGZ sowie durch immunnegative Färbungen von HEK 293-Zellen (Abb. 4.4) bestätigt. Diese exprimieren als immortalisierte Endothelzellen aus der embryonalen Rattenniere keine Adenosin-A1-Rezeptoren in ihrer Zellmembran (Hambrock, persönliche Mitteilung).

Die Immunfluoreszenzfärbungen an frisch isolierten JGZ müssen allerdings insofern kritisch betrachtet werden, da bei der Präparation der isolierten Zellen ein Effekt von in der Präparation möglicherweise vorhandenen Macula densa Zellen, Mesangium- oder glatten Muskelzellen nicht ausgeschlossen werden kann; obwohl eine sehr hohe Anreicherung der reninhaltigen Zellen erreicht wird (90 %, Della Bruna et al., 1991; < 95 %, Albinus et al., 1998). Zusätzlich erschweren eine hohe Ausschußrate und die Empfindlichkeit der Zellen die Aussagekraft der Ergebnisse. Schon kleinste Veränderungen ihres Milieus können pathologisch wirken und zu einer Veränderung der typisch kreisrunden Form und der Eigenschaften bis zum Absterben der Zellen führen (Albinus, persönliche Mitteilung). Dies muß im übrigen ebenso für alle anderen Versuche mit isolierten JGZ berücksichtigt werden.

Aufgrund einer möglichen eingeschränkten Aussagekraft der Immunfluoreszenzfärbungen an frisch isolierten JGZ wurden zur Lokalisation der Kir-Subtypen Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten von Rattennieren durchgeführt. Dies hat auch den Vorteil, daß die gesamte Nierenmorphologie beurteilt werden kann, mit erweiterten Aussagen über Fluoreszenzstärke und Fluoreszenzverteilung. Desweiteren sind Kryoschnitte von der Entnahme des Organs bis zur Fixierung als Präparat resistenter und länger haltbar.

Zur Lokalisierung der Kir-Subtypen an Kryoschnitten von Rattennieren wurden Doppelmarkierungen mit Antikörpern aus Kaninchen (Kaninchen-Anti-Ratte IgG: Kir2.1-AK, Kir2.2-AK, Kir6.1-AK) und einem Endothel-spezifischen Antikörper aus Maus gegen den „von Willebrand Faktor“ (Kreisberg et al., 1978) durchgeführt. Der „von Willebrand Faktor“-AK ermöglicht eine bessere Orientierung im Schnitt, da durch diese Färbung der Verlauf der Gefäße verfolgt und somit die genaue Lokalisation der einzelnen Kir-Kanäle im Verlauf des Gefäßes beurteilt werden kann.

Dabei stellte sich die Frage nach der Spezifität des „von Willebrand Faktor“-AKs. In Immunfluoreszenzbildern mit perfusionsfixierten Nieren (Pfaff et al., 1999) markiert der „von Willebrand Faktor“-AK die afferente Arteriole als Gefäß hervorragend, scheint aber verstärkt die Adventitia („Außenwand“) anstatt des luminal-liegenden Endothels zu färben. Er markiert zudem Kollagenstrukturen der Bowman'schen Kapsel und die Basalmembran der Tubuli (Abb. 4.5, 4.8 ; 4.9A und B). Dies steht in Einklang mit Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten mit perfusionsfixierten Rattennieren von Rauch, 2000.

Durch Anwendung einer Präparationstechnik mit nicht perfusionsfixierten Nieren (3.2.1.1; Kloor et al., 2000), wird die starke Affinität zu Kollagenstrukturen in der Bowman'schen Kapsel und den Tubuli aufgehoben. Die Färbung des „von Willebrand Faktor“-AKs reduziert sich spezifisch auf das Kapillarendothel im Glomerulum (Abb. 4.6 links), entsprechend immunhistologischen Färbungen von Kloor et al., 2000. In größeren Arterien hingegen bleibt die Affinität des „von Willebrand Faktor“-AKs zu Kollagenstrukturen erhalten (Abb. 4.6 und 4.7 rechts).

Die Affinität zu Kollagenstrukturen v.a. in Gefäßen könnte auf die Eigenschaft und Funktion des „von Willebrand Faktors“ als Faktor VIII, antihämophiles Globulin A des Blutgerinnungssystems zurückzuführen sein. Dieser wird von Endothelzellen gebildet und ermöglicht bei der Blutgerinnungskaskade die Anlagerung der Thrombozyten an Kollagenfasern. Bei der Perfusion der Organe mit Paraformaldehyd wird direkt Einfluß auf das Herz-Kreislauf-System mit seinen nachfolgenden Organen genommen. Dadurch wird möglicherweise die Blutgerinnungskaskade aktiviert, „von Willebrand Faktor“ freigesetzt, der sich an den Kollagenfasern anlagert und dort vom Antikörper nachgewiesen wird.

Der „von Willebrand Faktor“-AK zeigt bei gleicher Konzentration für beide Präparationstechniken eine spezifische Endothelfärbung im luminalen Anteil der Gefäßwand (Abb. 4.7). Die Anfärbung des Endothels von nicht perfusionsfixierten Rattennieren ist jedoch deutlich stärker ausgeprägt gegenüber der schwachen Endothelmarkierung von perfusionsfixierten Nieren (Abb. 4.7).

In einer Doppelfärbung von perfusionsfixierten Nierenschnitten und einem Kir-AK (als zweite Markierung im Gefäßwandbereich) erscheinen die Endothelzellen, aufgrund der schwachen aber spezifischen Anfärbung des Endothels gegenüber der Adventitia als falsch negativ, d.h. nicht gefärbt.

Die Spezifität des „von Willebrand Faktor“-AKs muß somit in der Präparationstechnik an Kryoschnitten von perfusionsfixierten Nieren (Pfaff et al., 1999) auf Kollagen erweitert werden, der Antikörper liefert aber kein falsches Signal. Durch Fixierung der Organe bleibt die Morphologie auch nach der Färbung erhalten und ist bei der genauen Lokalisation des Kanals in der Niere von Vorteil.

Die Spezifität des jeweiligen Antikörpers wurde mit Positiv- und Negativkontrollen (3.2.1.2.1) im Gehirn sowie mittels Western Blot bestätigt. Immunhistologische Färbungen des Groß- und Kleinhirns weisen dabei ein spezifisches Färbemuster für die Kanäle Kir6.1, Kir2.1 und Kir2.2 auf (Abb. 4.12). Diese Ergebnisse wurden von Professor Dr. med Veh (Charité, Berlin) nach Durchsicht als typisch und spezifisch bestätigt und stehen in Einklang mit Untersuchungen von Thomzig et al., 2001, Thomzig et al., 2003 und Prüss et al., 2003.

5.1.2 Western Blot

Auf Proteinebene kann der Nachweis des jeweiligen Kaliumkanal-Proteins im Western Blot bestätigt werden (Abb. 4.13). Dabei zeigt der Western Blot gegenüber der Immunfluoreszenz eine höhere Sensitivität in der Proteindetektion (Harsch, persönliche Mitteilung). Man verliert aber in komplexen Organen die Information über die Lokalisation.

Zur Identifikation der spezifischen Kaliumkanäle der Rattenniere wurden Antikörper, entsprechend der Immunhistologie (Veh, R; siehe 2.4), und polyklonale Kir2.1^a-AK sowie Kir2.3^a-AK (Alomone, siehe 2.4) verwendet.

Die Funktionalität der Methode kann zusätzlich zu meinen Ergebnissen der Kir-Kanäle mit dem ubiquitär vorhandenen Zytoskelett-Protein β -Actin als Positivkontrolle gezeigt werden (Abb. 4.13: β -Actin). Erstens zeigt β -Actin durchgehend klar definierte Banden für Niere und Gehirn von NaCl-arm ernährten Ratten und zweitens ist die Stärke der Bande jeweils der Proteinmenge angeglichen. Bei einer Proteinverdünnung von 1:10 ist die Bandenexpression sehr stark, bei 1:50 entsprechend schwächer und bei 1:100 relativ gering ausgeprägt. Desweiteren wurde mit einer Kontrollniere von einer unbehandelten Ratte und von einer an Diabetes mellitus erkrankten Ratte (DM) gearbeitet. Erneut kann eine proteinabhängige Expressionsstärke an β -Actin gezeigt und somit die Methode bestätigt werden (Abb. 4.13: β -Actin, Kontrollniere, DM). Anhand der Expression von β -Actin in den verschiedenen Nieren kann der Einfluß einer NaCl-arm Diät im Vergleich zu unbehandelten Ratten und an Diabetes mellitus erkrankten Ratten untersucht werden. Die Expression von β -Actin ist unter physiologischen Bedingungen (unbehandelte Kontrollniere) niedriger, zeigt jedoch dasselbe spezifische Muster wie bei Nieren von NaCl-arm ernährten Ratten auf (Abb. 4.13: β -Actin, Kontrollniere). Im Hinblick auf eine durch eine NaCl-arme Diät induzierte Transformation von glatten Muskelzellen in reninsezernierende Zellen (Cantin et al., 1977) scheint dieses Ergebnis überraschend, da glatte Muskelzellen, im Gegensatz zu den plumpen Reninzellen, mit einer Vielzahl von Aktinfilamenten ausgestattet sind.

Die Proteinextraktion für den Western Blot erfolgte jedoch nicht selektiv aus den JGZ, sondern aus der ganzen Niere, da eine NaCl-arme Diät diverse morphologische Änderungen der gesamten Niere bewirken kann. So könnte die Zunahme der Proteinexpression von β -Actin eher auf eine NaCl-arme Diät induzierte Erhöhung der Tubulusrückresorption von Na^+ und dadurch eine Steigerung der Aktivität des Bürstensaums zurückzuführen sein. Konsekutiv könnte dies eine Hypertrophie oder eine Proliferation des Bürstensaums mit seiner Gerüststruktur den Mikrovilli aus Aktinfilamenten bewirken.

5.1.3 RT-PCR

Die RT-PCR zur Analyse von Gen-Transkripten der Kir2.x-Subtypen zeigt eine hohe Sensitivität und schnelle Ergebnisse, was in dieser Arbeit anhand des mRNA-Nachweises von Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.3 gezeigt werden konnte. Wie für den Western Blot ist es wichtig, eine geeignete interne Kontrolle zu finden. Dafür wurde Cyclophilin verwendet, das ubiquitär exprimiert wird und eine verlässliche Kontrolle bietet (Harding und Handschumacher, 1988).

Die beschriebene Methode der semiquantitativen PCR ist ausgelegt, Expressionsunterschiede einer mRNA-Spezies, beispielsweise von Kir2.1 in verschiedenen Zellen oder Gewebe zu detektieren. Die entsprechend ermittelten Werte der relativen mRNA Expression in den JGZ, der Niere und dem Gehirn eines Kir-Kanals, können verglichen werden und Rückschlüsse auf die relative mRNA Menge, der in der PCR amplifizierten Kir-Sequenzen des jeweiligen Gens in Niere, JGZ und im Gehirn geben (Abb. 4.15B und 4.17B).

Das Expressionsniveau verschiedener Gene (relative mRNA Expression von Kir2.1 und Kir2.2) kann mit ihrer Hilfe jedoch nur in eingeschränktem Maße verglichen werden. Bei sehr großen Unterschieden sind Aussagen unter folgenden Voraussetzungen erlaubt:

1. Die Ethidiumbromid-Inkorporation eines DNA-Fragments ist seiner Länge direkt proportional. Hat man die Primer für die zu vergleichenden Gene so gewählt, daß das damit amplifizierte Produkt unterschiedlich lang ist, muß

die gemessene ODI der entstehenden Banden ihrer Länge rechnerisch angepaßt werden.

2. Die Amplifikationskurve für das Kontrollgen muß für alle untersuchten Gene mit der gleichen Zyklenzahl erfolgen.
3. Die eingesetzte Reverse Transkriptase muß von hervorragender Qualität sein. Die zu vervielfältigenden Fragmente der verschiedenen Gene sind meistens unterschiedlich weit vom poly(A)-Schwanz der mRNA entfernt, so daß die cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase nicht vorzeitig abbrechen darf, wenn auch noch weit vom poly(A)-Signal entfernte Fragmente annähernd quantitativ abgeschrieben werden sollen.

Gerade die stark unterschiedliche Länge der zu amplifizierenden Produkte für Kir2.1 bei 326 bp und für Kir2.2 bei 836 bp könnte trotz gleicher Zyklenzahl für Cyclophilin (257 bp) und einer qualitativ hervorragenden reversen Transkriptase zu Fehleinschätzungen führen. Der Einsatz des mehr als doppelt so langen Primers von Kir2.2 im Gegensatz zu Kir2.1 könnte durch ein längeres mRNA-Amplikon mit entsprechender Ethidiumbromid-Inkorporation zu einem stärkeren Signal in der RT-PCR führen. Dies könnte die starke mRNA-Expression für Kir2.2 in den JGZ, der Niere und dem Gehirn in der semiquantitativen RT-PCR erklären (Abb. 4.17), obwohl Kir2.2 im Western Blot schwach und in der Immunhistologie der Niere gar nicht gezeigt werden konnte.

Zudem stammen die Ergebnisse nur von der Probenaufbereitung des gezeigten Gels (n=1) von Kir2.1 und Kir2.2 (siehe S. 121, 122 und Abb. 4.15 , Abb. 4.17).

Ein Direktvergleich der relativen mRNA Expression in den JGZ von Kir2.1 und Kir2.2 ist somit in seiner Aussagekraft eingeschränkt und könnte zu einer Verzerrung der *in vivo* tatsächlich vorliegenden Verhältnisse der Genexpressionen von Kir2.1 und Kir2.2 in den JGZ, der Niere und im Gehirn führen (Abb. 5.1).

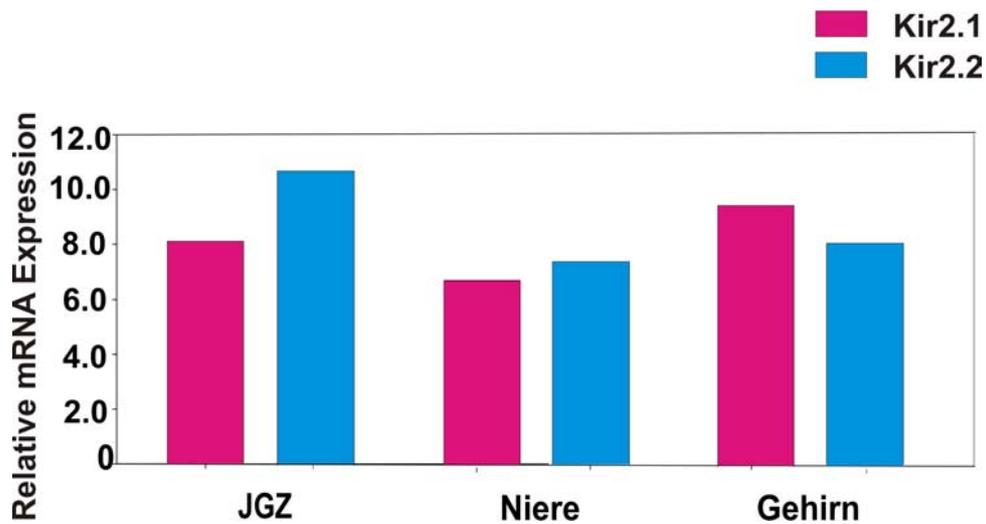


Abb. 5.1: Vergleich der mRNA Expression von Kir2.1 und Kir2.2 in JGZ, Niere und Gehirn der Ratte. Die Balken repräsentieren das relative mRNA Expressionsniveau von Kir2.x, das mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR ermittelt wurde. Der Direktvergleich der relativen mRNA Expression in den JGZ von Kir2.1 und Kir2.2 ist jedoch in seiner Aussagekraft eingeschränkt und könnte zu einer Verzerrung der *in vivo* tatsächlich vorliegenden Verhältnisse der Genexpressionen von Kir2.1 und Kir2.2 in den JGZ, der Niere und im Gehirn führen (vgl. Abb. 4.15 und Abb. 4.17).

5.2 Diskussion der Ergebnisse der Kir-Subtypen

Kochsalzrestriktion gilt als etablierte Methode, um das Renin-Angiotensin-Aldosteron System zu aktivieren (Hackenthal et al., 1990). Bei diesem Modell kommt es zur Zunahme reninhaltiger Zellen in der afferenten Arteriole, einer Steigerung der Reninfreisetzung aus den JGZ und einer vermehrten Natrium Rückresorption durch erhöhte Aldosteronwirkung. Sosath, 1999 und Rauch, 2000 konnten zeigen, daß durch kochsalzarme Diät die Anzahl der reninhaltigen Zellen, ebenso wie die spontane Reninsekretion signifikant zu nehmen. Auch die Veränderung der Gesamtexpressionsstärke der Ionenkanäle und Transporter unter einer NaCl-armen Diät ist bekannt (Masilamani et al., 2002). In einzelnen JGZ ist das prominente Vorkommen der Kir-Ströme aber nicht von einer NaCl-armen Diät abhängig. Mittels elektrophysiologischer Methoden konnten auch in unbehandelten JGZ häufig vorkommende Kir2.x-Kanäle nachgewiesen werden (Russ in Leichtle et al., 2004).

Die Behandlung der Ratten mit einer NaCl-armen Diät induziert somit eine Steigerung der Anzahl an reninsezernierenden Zellen und erleichtert die Detektion in der Immunfluoreszenz und Untersuchungen der Expression in der Niere mittels Western Blot und RT-PCR. Die Existenz der Kir-Kanäle in einzelnen nativen JGZ wird aber nicht verändert und kann durch ein umfassendes Expressionsprofil in JGZ , der Niere und im Gehirn bestätigt werden.

5.2.1 Kir6.1

Kir6.1 gehört zur Klasse der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle und bildet die porenformende α -Untereinheit des funktionellen vaskulären K_{ATP} -Kanals. Als „ubiquitously expressed ATP-sensitive potassium channel“ ist er in fast allen Geweben anzutreffen, v.a. in den Gefäßmyozyten (Babenko et al., 2000a) sowie dem Endothel (Mederos y Schnitzler et al., 2000) und spielt eine Rolle während der Nierenentwicklung (Huber et al., 2000; Braun et al., 2002).

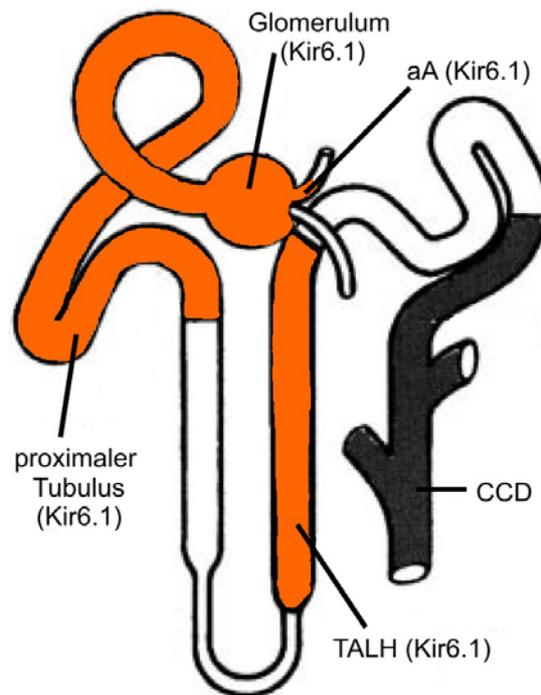


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der Lokalisation von Kir6.1 (rot) in den verschiedenen Segmenten des Nephrons und im Sammelrohr (vgl. Abb. 5.3). Kir6.1 konnte in der afferenten Arteriole (aA), im Glomerulum, im proximalen Tubulus und im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife (TALH) nachgewiesen werden. Ein Vorkommen im anschließenden Sammelrohr (CCD) ist in der Literatur nicht beschrieben und wurde in dieser Arbeit nicht gezielt untersucht.

Kir6.1 in JGZ und Niere

Die reninsekretionsstimulierende Wirkung von K_{ATP} -Kanalöffnern *in vivo* und *in vitro* (Ferrier et al., 1989; Richer et al., 1990; Pratz et al., 1991; Linseman et al., 1995; Vallon et al., 1998; Jensen et al., 1998) weist auf eine elementare Funktion der K_{ATP} -Kanäle mit ihrer Untereinheit Kir6.1 in den JGZ hin. Darüberhinaus machen elektrophysiologische Untersuchungen mit Levromakalim und Glibenclamid an K_{ATP} -Kanälen die Existenz von K_{ATP} -Kanälen in reninsekretierenden Zellen mehr als wahrscheinlich (Russ et al., 1999).

An Kryoschnitten von Rattennieren kann erstmals die genaue Lokalisation der Kir6.1-Kanäle in den JGZ im Bereich des juxtaglomerulären Apparates gezeigt werden (Abb. 4.5). Kir6.1 zeigt in Kryoschnitten mit angeschnittenem Gefäß

(nicht gezeigt) eine Lokalisation entlang des distalen Teils der afferenten Arteriole, entsprechend dem Bereich der reninsezernierenden Zellen (Taugner et al., 1982; Bührle et al., 1984; Hackenthal et al., 1990; Rauch, 2000). In diesen Zellen kann durch Modulierung der Kanäle die Reninsekretion über eine Veränderung des Membranpotentials reguliert werden. Sie spielen aber wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle in der normalen Regulation des Membranpotentials in JGZ. Vielmehr werden sie erst bei einer metabolischen Verarmung der Zellen stark aktiviert.

Eine Studie mit Kir6.2 Knockout-Mäusen identifizierte Kir6.1 als funktionelle porenformende Untereinheit des K_{ATP} -Kanals in vaskulären glatten Muskelzellen (Suzuki et al., 2001). Entsprechend der zu erwartenden Lokalisation kann Kir6.1 in der Gefäßmuskulatur von Arterien (Babenko et al., 1998; Babenko et al., 2000b) mittels Immunhistologie dargestellt werden (Abb. 4.6 rechts). In einigen Organen (v.a. dem Herzen) regulieren die funktionellen K_{ATP} -Kanäle mit der Untereinheit Kir6.1 den Gefäßtonus (Quayle et al., 1997; Quast, 1993) und spielen so eine Rolle in der Regulation der Organperfusion.

Analog der Lokalisation von Kir6.1 in Endothelzellen (Mederos y Schnitzler et al., 2000) zeigt Kir6.1 in Kryoschnitten eine spezifische Endothelfärbung der Kapillaren im Glomerulum sowie in größeren Arterien (Abb. 4.5 und 4.6), wo sie an der Gefäßregulation und -versorgung beteiligt sind. Die diffuse Grünfärbung zwischen den Kapillarendothelschlingen im Glomerulum könnte auf das Vorkommen von Kir6.1 in Mesangialzellen zurückzuführen sein, zumindest wurde dort eine deutliche Genexpression nachgewiesen (Szamosfalvi et al., 2002). Die Mesangialzellen werden dabei durch eine Art autokrines System über SUR2B mit der diabetischen Glomerulopathie in Verbindung gebracht (Szamosfalvi et al., 2002).

Die Lokalisation von Kir6.1 in den Tubuli erfolgt mit zwei Markersubstanzen, Rhodamin-konjugierten Phalloidin für den proximalen Tubulus und dem Tamm-Horsfall-Antikörper für den dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife der Rattenniere (Abb. 4.10A und B). Dabei zeigen beide Marker entsprechend Pfaff et al., 1999 das für sie spezifische Färbemuster.

Mit Hilfe Rhodamin-konjugierten Phalloidins kann Kir6.1 im proximalen Tubulus diffus basolateral nachgewiesen werden (Abb. 4.10A), was in Einklang mit einem beschriebenen schwachen Signal für Kir6.1 in der basolateralen Membran im adulten proximalen Tubulus steht (Braun et al., 2002). Eine von Braun et al., 2002 beschriebene Lokalisation in der apikalen Membran des proximalen Tubulus kann allerdings nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.10A). Das Signal von Kir6.1 in der basolateralen Membran des proximalen Tubulus könnte auch auf eine mögliche Lokalisation von Kir6.1 in Mitochondrien des Tubulus oder eine intrazelluläre (zytoplasmatische) Lokalisation zurückzuführen sein (Braun et al., 2002).

Eine Lokalisation des K_{ATP} -Kanals in der inneren Membran von Mitochondrien wird beispielsweise in der Leber und im Skelettmuskel von Ratten (Inoue et al., 1991; Suzuki et al., 1997) und im Gehirn (Zhou et al., 1999) beschrieben. Liu et al., 2001 zeigen, daß mito K_{ATP} -Kanäle im Herzen in ihren pharmakologischen Eigenschaften den Kir6.1/SUR1 Kanälen ähnlich sind. Eine spezifische Kollokalisierung von Kir6.1-Antikörpern mit Mitochondrien konnte allerdings an Färbungen in isolierten Herzmuskelzellen (Seharaseyon et al., 2000) und im Kleinhirn (Thomzig et al., 2001) nicht gezeigt werden.

Neben der oben genannten Arbeit von Braun et al., 2002 wird eine Lokalisation von Kir6.1 im proximalen Tubulus in neonatalen Rattennieren (Anzai et al., 1997) und in adulten Kaninchennieren (Brochiero et al., 2002) beschrieben.

Nach einer renalen Ischämie konnte eine schnelle reaktive Zunahme der Kir6.1-mRNA-Expression im proximalen Tubulus der Rattenniere beobachtet werden (Sgard et al., 2000). Analog zu kardialen und cerebralen Ischämien (Nichols und Lederer, 1991; Yamada et al., 2001; Seino und Miki, 2003) könnte dem K_{ATP} -Kanal mit seiner Untereinheit Kir6.1 auch bei renalen Ischämien eine mögliche protektive Wirkung zugesprochen werden. Das bei der renalen Ischämie erniedrigte intrazelluläre ATP könnte dabei zu einer Öffnung der K_{ATP} -Kanäle mit konsekutiver Hyperpolarisation der Zellen führen. Dadurch werden elektrogene Transporter, die die Zellen innen negativer machen, in ihrer Aktivität gehemmt.

So könnte eine Hyperpolarisation der Zelle eine Reduktion des K^+ -Ausstrom bewirken und dem ischämiebedingten massiven intrazellulären K^+ -Verlust und den anschließenden hypoxischen Schäden im proximalen Tubulus entgegen wirken.

Im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife lokalisiert sich Kir6.1 ebenfalls basolateral liegend (Abb. 4.10B). Das Tamm–Horsfall-Markerprotein zeigt dabei ein „zahnradförmig-gestochenes“ Färbemuster, das als spezifisch für diesen Tubulusabschnitt der Niere gilt (Pfaff et al., 1999).

Ein Hinweis auf die Expression von Kir6.1 könnte der Nachweis von SUR2B im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife im Cortex der Rattenniere sein (Tanemoto et al., 2000), da SUR2B, als regulatorische β -Untereinheit, funktionelle K_{ATP} -Kanäle mit Kir6.1 bilden kann und ihr Vorkommen *in vivo* belegt ist. Im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife hat Kir6.1 sehr wahrscheinlich ebenfalls eine protektive Wirkung bei Ischämien und könnte über Hyperpolarisation eine Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase und somit ein Einsparen von ATP bewirken. Eine Hemmung des $Na^+-K^+-2Cl^-$ -Kotransporters ist aber mit Sicherheit nicht beteiligt, da dadurch gerade ein K^+ -Verlust verursacht wird (Nebenwirkung der Schleifendiuretika).

Bei dem nicht Anti-Tamm–Horsfall-markierten Tubulus (\uparrow) in Abbildung 4.10B mit positivem Kir6.1 Nachweis könnte es sich entsprechend den dargestellten Ergebnissen um einen proximalen Tubulus handeln, der in seiner Morphologie ein hochzylindrisches Epithel mit Bürstensaum aufweist. Eine Lokalisation von Kir6.1 im Sammelrohr ist eher nicht zu erwarten, da dieser in der Ontogenese der Niere zwar in der frühen Entwicklung eine Rolle spielt, aber schon ab dem 14. Embryonaltag herunterreguliert wird und postnatal im Sammelrohr des Cortex und der äußeren Medulla nicht mehr detektiert werden kann (Braun et al., 2002).

Die Spezifität des Kir6.1 Antikörpers wurde im Western Blot nachgewiesen (Abb. 4.13) und steht in Einklang mit Proteinnachweisen von Braun et al., 2002. Als weiterer Proteinnachweis des Kanals wird somit die Existenz von Kir6.1 in der Niere von NaCl-arm ernährten Ratten untermauert und die Lokalisation in der Niere und dort besonders in den JGZ sehr wahrscheinlich gemacht.

Kir6.1 im Gehirn

Im Gehirn kann Kir6.1 signifikant lokalisiert und mit einer entsprechenden Bandenexpression im Western Blot bestätigt werden (Abb. 4.13). Die Immunlokalisation von Kir6.1 in Kryoschnitten zeigt dabei ein sehr spezifisches Expressionsmuster in Groß- und Kleinhirn (Abb. 4.12a-c), analog zu Ergebnissen von Thomzig et al., 2001, Thomzig et al., 2003. Im zentralen Nervensystem befindet sich Kir6.1 zu einem Anteil in Neuronen (Lee et al., 1999; Zhou et al., 1999) und cholinergen Interneuronen (Thomzig et al., 2003). Überwiegend wird der Kanal jedoch in Astrozyten in Groß- und Kleinhirn (Abb. 4.12b, c) oder Astrozyten-verwandten Gliazellen wie in Tanyzyten des dritten Ventrikels (Abb. 4.12a), der Bergmannschen Glia im Kleinhirn (Abb. 4.12b) sowie in den Müllerzellen der Retina lokalisiert (Skatchkov et al., 2001; Eaton et al., 2002; Skatchkov et al., 2002). Ein weiteres Charakteristikum von Kir6.1 gegenüber Kir2.1 und Kir2.2 liegt in der fehlenden Lokalisation im Epithel des Plexus choroideus des dritten Ventrikels im Großhirn (Abb. 4.12a). Den Kir6.1-Kanälen wird dabei generell eine Schutzfunktion bei cerebralen Ischämien (Yamada et al., 2001) und Spasmen (Seino und Miki, 2003) sowie eine Funktion bei der Freisetzung von Transmittern zugesprochen, was für Glukoseempfindliche Neurone von Bedeutung ist (Liss und Roeper, 2001).

5.2.1.1 Pharmakologische Bedeutung der Kir6.1SUR-Kanäle

In ihrer zentralen Rolle bei der metabolischen Regulation und Signalübertragung der Zellen sind die K_{ATP} -Kanäle auch aufgrund der Möglichkeit der pharmakologischen Beeinflussung von Bedeutung. Das bekannteste Beispiel dafür ist der Einsatz von Sulfonylharnstoffen (z.B. Glibenclamid) in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II. Die Wirkung der Sulfonylharnstoffe auf die K_{ATP} -Kanäle in β -Zellen des Pankreas führt zu einer erhöhten Insulinausschüttung und einer Verbesserung der metabolischen Stoffwechselsituation der Erkrankten.

Entsprechend diesem Beispiel könnte sich auch die Lokalisation von K_{ATP} -Kanälen in cholinergen Interneuronen des Striatums auf die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten in bezug auf psychoneuroleptische Erkrankungen wie z.B. dem Parkinson Syndrom auswirken (Thomzig et al., 2003).

Durch die nachgewiesene Existenz von K_{ATP} -Kanälen in den JGZ, ihre eindeutige Lokalisation in diesen Zellen, eine beschriebene modulierende Rolle bei der Reninsekretion und eine sehr gute pharmakologische Manipulierbarkeit könnten pharmakologisch neue Möglichkeiten in der Therapie der Hypertonie eröffnet werden. So könnte ein selektiver K_{ATP} -Blocker der nur vaskuläre K_{ATP} -Kanäle (Kir6.1/SUR2B) in den JGZ schließt sinnvollerweise auch die Reninsekretion hemmen. Eine Hemmung der Reninsekretion durch den Kanalblocker Glibenclamid konnte *in vivo* beobachtet werden (Linseman et al., 1995). Auf der Ebene des Renins könnte so innerhalb des Renin-Angiotensin-Adosteron Systems medikamentös eingegriffen und konsekutiv eine Senkung des Blutdrucks erreicht werden. Allerdings kann ein vasokonstriktorischer Effekt der K_{ATP} -Blocker nicht ausgeschlossen werden, was an Patienten unter der Einnahme von Glibenclamid nachgewiesen wurde (Yosefy et al., 2004).

Eine medikamentöse Therapie mit K_{ATP} -Öffnern ist ebenfalls problematisch, da der Öffner zwar vasodilatatorisch wirkt, aber gleichzeitig die Reninsekretion über die K_{ATP} -Kanäle und über Barorezeptoren (positives Feedback bei Blutdruckabfall) stimulieren würde.

5.2.2 Die klassischen einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle (Kir2.x)

Die klassischen einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle spielen eine elementare Rolle in der Aufrechterhaltung des Membranruhepotentials und der Regulation der Erregbarkeit der Zelle in verschiedenen Geweben.

Auf ihr Vorkommen und ihre spezifische Funktion wurden Kir2.x-Kanäle überwiegend untersucht im Herzen (Preisig-Müller et al., 1999; Liu et al., 2001; Picones et al., 2001; Schram et al., 2002; Melnyk et al., 2002; Zobel et al., 2003) in glatten Muskelzellen von Arterien (Bradley et al., 1999; Zaritsky et al., 2000; Karkanis et al., 2003) und im Gehirn (Karschin et al., 1997; Prüss et al., 2003). Neuere Studien geben zudem Aufschluß über die „Reifung und Transport“ (trafficking), das funktionelle Vorkommen der Kir2.x-Kanäle *in vivo* sowie mögliche Homo- oder Heteromerbildung (Picones et al., 2001; Preisig-Müller et al., 2002; Schram et al., 2002; Melnyk et al., 2002; Zobel et al., 2003; Leonoudakis et al., 2004a; Leonoudakis et al., 2004b; Karkanis et al., 2003; Bendahhou et al., 2003).

Ein Vorkommen von Kir2.x in reninsezernierenden JGZ wurde durch Strom- und Spannungsmessungen wahrscheinlich gemacht (Kurtz und Penner, 1989; Chilton und Loutzenhiser, 2001; Russ et al., 2003b). Durch Messungen von NaCl-arm ernährten Ratten sowie an normal ernährten Ratten konnte dieser Stromtyp in JGZ bestätigt werden (Leichtle et al., 2004). Welcher Kanal diesem Strom auf molekularer Ebene zugrunde liegt und wie dieser in seiner funktionellen Form vorliegen könnte, erforderte ein umfassendes Expressionsprofil der einzelnen Kir-Kanäle in den JGZ. Das erstellte Expressionsprofil wird im Anschluß auf seine mögliche Funktion bei der Reninsekretion diskutiert.

5.2.2.1 Kir2.1

Kir2.1 ist als starker Einwärtsgleichrichter bekannt, der aufgrund seiner elektrophysiologischen Eigenschaften sehr wahrscheinlich für das Aufrechterhalten des Ruhemembranpotentials in den JGZ verantwortlich ist. Erstmals kann auf Protein- und RNA-Ebene der molekulare Nachweis von Kir2.1 in den JGZ erbracht werden und ergibt insgesamt auch in Niere und Gehirn ein aussagekräftiges und signifikantes Expressionsprofil (Leichtle et al., 2004).

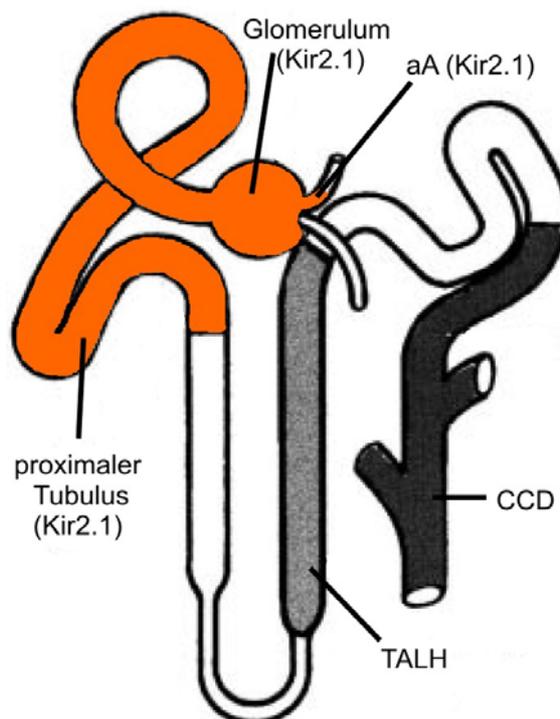


Abb. 5.3: Schematische Darstellung der Lokalisation von Kir2.1 (rot) in den verschiedenen Segmenten des Nephrons und im Sammelrohr (vgl. Abb. 5.2).

Kir2.1 konnte in der afferenten Arteriole (aA), im Glomerulum, im proximalen Tubulus, nicht jedoch im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife (TALH) nachgewiesen werden. Ein Vorkommen im Sammelrohr (CCD) ist in der Literatur nicht beschrieben und wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Kir2.1 in JGZ und Niere

Mittels immunhistologischen Kryoschnittfärbungen der Niere kann die Lokalisation von Kir2.1 in reninsezernierenden JGZ (Abb. 4.8 und 4.9A) eindeutig gezeigt werden. Kir2.1 lokalisiert sich entlang der afferenten Arteriole bis zum Mündungsbereich in das Glomerulum und zieht sich teilweise bis in den juxtaglomerulären Apparat. Im distalen Anteil der afferenten Arteriole zeigt die Lokalisation von Kir2.1 dabei ein vergleichbares Bild, wie die Lokalisation von reninsezernierenden JGZ in Paraffinschnitten von Taugner et al., 1982, Bührle et al., 1984 sowie der immunhistologische Reninnachweis an Kryoschnitten von Rauch, 2000.

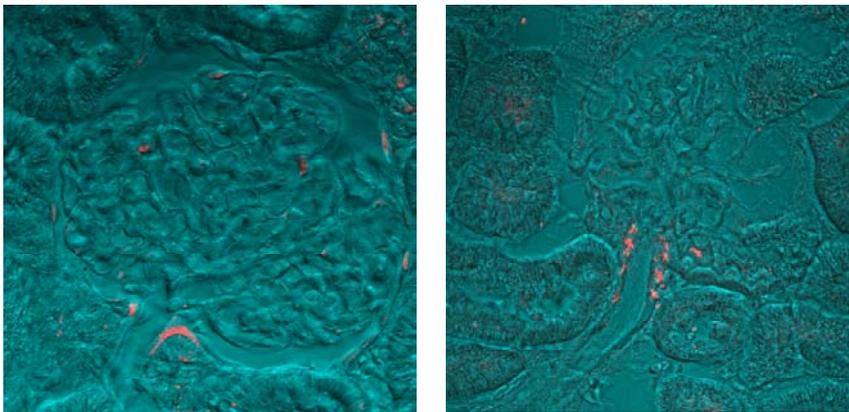


Abb. 5.4: Lokalisation von Kir2.1 (links; vgl. Abb. 4.8) und Renin (rechts; Rauch, 2000) im distalen Teil der afferenten Arteriole der Niere von NaCl-arm ernährten Ratten. Die Kryoschnitte wurden mit Kaninchen Kir2.1-AK bzw. Anti-Rattenrenin-AK in Verbindung mit Alexa 488 Ziege Anti-Kaninchen IgG gefärbt. Der Maßstab für beide Bilder gibt 50µm an (modifiziert nach Leichtle et al., 2004).

Neben dem immunhistologischen Proteinnachweis ist Kir2.1 auf der RNA-Ebene mit einer quantitativ hohen relativen mRNA-Expression in den JGZ exprimiert (Abb. 4.15). Interessanterweise exprimieren die JGZ gegenüber der Gesamtniere relativ mehr Kir2.1-mRNA. Erklärungen hierfür finden sich in der

starken Prominenz der Kir2.1-Kanäle in den JGZ, was an elektrophysiologischen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte (Russ, persönliche Mitteilung). Mittels single cell RT-PCR kann der mRNA-Nachweis von Kir2.1 zudem in einer einzelnen isolierten JGZ nachgewiesen werden. Der erstmalige Nachweis von Kir2.1 auf Protein- und mRNA-Ebene und die elektrophysiologische Übereinstimmung der Ergebnisse lassen ohne Zweifel auf die Existenz von Kir2.1 in den JGZ schließen.

In der Niere zeigt Kir2.1, neben den JGZ, weitere spezifische, wenn auch weniger intensive immunhistologische Lokalisationen. Im Glomerulum kann, analog zu Kir6.1, eine Lokalisation von Kir2.1 in Endothel- und Mesangialzellen, nicht aber in Podozyten (Abb. 4.8 und 4.11) gezeigt werden. Eine positive Expression von Kir2.1 im Glomerulum wurde schon durch einen mRNA-Nachweis beschrieben (Derst et al., 2001). Auch in Endothelzellen ist das spezifische Vorkommen von Kir2.1 belegt (Stonehouse et al., 1999; Preisig-Müller et al., 1999; Liu et al., 2001), wo sie zusammen mit der glatten Gefäßmuskulatur über eine Hyperpolarisation vasodilatatorisch wirken und an der Gefäßregulation beteiligt sind (Eckman und Nelson, 2001).

Analog zu Kir6.1 kann Kir2.1 signifikant im proximalen Tubulus (Abb. 4.11A) lokalisiert werden. Dort befindet sich Kir2.1 spezifisch luminalseitig im Bürstensaum des proximalen Tubulus. Die Hauptfunktion des proximalen Tubulus besteht in der Rückresorption von Glucose, Na^+ , K^+ und Wasser (ca. 65% des Ultrafiltrats). Folglich könnte die signifikant luminal Lokalisation von Kir2.1 im Bürstensaum auf eine Beteiligung beim Resorptionsmechanismus hinweisen. So könnte Kir2.1 durch Stabilisierung des Membranpotentials die tubuläre Leitfähigkeit von K^+ und Na^+ aufrecht erhalten, wodurch der epitheliale K^+ -Transport sowie der Na^+ -Symport und -Antiport des Resorptionsmechanismus gewährleistet wird. Desweiteren trägt ein stabiles Membranpotential zur Aufrechterhaltung der Funktion des Na^+ , 3HCO_3^- Kotransporters mit seinen elektrogenen Transporten bei und damit der Regulierung des Säure-Basen-Haushalts. Im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife gibt es, im Vergleich zu Kir6.1, keinen Anhalt auf eine

Lokalisation von Kir2.1 (Abb. 4.11B), was bedeutet, daß Kir2.1 in der Harnkonzentration eine geringere Rolle spielt. Weitere Kir2.1 Tubuli (luminal lokalisiert) scheinen jedoch entsprechend Lage und Morphologie auf eine Existenz im distalen Tubulus (Macula densa) hinzuweisen (Abb. 4.8, 4.9, 4.11A und B). Kir2.1 könnte dort den Na⁺-Einstrom induzierten depolarisierenden Effekt auf die luminale Zellmembran regulieren und somit eine angemessene, nicht zu starke Sekretion von K⁺ über luminale K⁺-Kanäle gewährleisten. Die Lokalisation von Kir2.1 in den unterschiedlichen Abschnitten der Tubuli stehen in Einklang mit Untersuchungen von Kir2.1 in der menschlichen Niere, wo ebenfalls eine mRNA-Expression im proximalen Tubulus, im Gegensatz zu einer negativen Expression im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife und im Sammelrohr beschrieben wird (Derst et al., 2001). Dabei zeigt Kir2.1 im proximalen Tubulus interessanterweise eine Kolo­kalisierung mit Kir5.1 (ebenfalls wie Kir2.1 auf dem menschlichen Chromosom 17q 23.1-24.2 lokalisiert), der als möglicher negativer Regulator auf die Leitfähigkeit von Kir2.1 wirken könnte (Derst et al., 2001).

Die Proteinexpression des Kanals in der Niere kann im Western Blot und auf RNA-Ebene mittels PCR bestätigt werden (Abb. 4.13 und Abb. 4.15).

Kir2.1 im Gehirn

Kir2.1-mRNA wird, wie bei Karkanis et al., 2003, im Gehirn sehr stark exprimiert (Abb. 4.15) und der Nachweis des Kanal-Proteins Kir2.1 im Western Blot ist möglich (Abb. 4.13). Prüss et al., 2003 und Keren-Raifman et al., 2000 hatten ähnliche Ergebnisse. Die genaue Lokalisation des Kir2.1-Kanals im Gehirn mittels immunhistologischen Färbungen zeigt ein spezifisches Verteilungsmuster im Großhirn, wohingegen im Kleinhirn (Abb. 4.12e) nur eine maximal gering diffuse Lokalisation zu erkennen ist, entsprechend Isomoto et al., 1997. Ein prominentes Vorkommen im Bereich der Pons wird beschrieben (Derst et al., 2001). Im Großhirn wird Kir2.1, wie Kir6.1, im Ependym lokalisiert (Stonehouse et al., 1999). Im Gegensatz zu Kir6.1 ist Kir2.1 (sowie Kir2.2) zusätzlich im Epithel des Plexus choroideus des Seitenventrikels zu erkennen (Abb. 4.12d). Ein Charakteristikum von Kir2.1 ist das prominente Vorkommen in

Neuronen mit ihrem Perikaryon und Dendriten im Cortex des Großhirns (Abb. 4.12f), was in Einklang steht mit Untersuchungen von Prüss et al., 2003. Im Gehirn spielen die Kir2.x-Kanäle in der Stabilisierung des Membranpotentials v.a. in Neuronen eine wichtige Rolle und sind auch als wichtige Komponente an der Signalübertragung im Nervensystem beteiligt. Die leicht diffuse Lokalisation im Kleinhirn könnte auf eine geringe Bedeutung von Kir2.1 für die Funktion des Kleinhirns hinweisen.

5.2.2.2 Kir2.2

Kir2.2 wird in seiner Funktion als Einwärtsgleichrichter ebenfalls eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Membranpotentials zugesprochen. Sein Vorkommen in Herzmuskelzellen und Endothel (Wible et al., 1995; Liu et al., 2001; Preisig-Müller et al., 1999) sowie in glatten Muskelzellen von Gefäßen (Karkanis et al., 2003) ist beschrieben.

Kir2.2 in JGZ und Niere

Durch eine deutliche mRNA-Expression von Kir2.2 in den JGZ und in der Niere konnte, neben Kir2.1, der erste Nachweis von Kir2.2 auf Genebene in den JGZ der Rattenniere erbracht werden (Abb. 4.17 und Abb. 4.13).

Das Kanalprotein in der Niere zeigt im Western Blot eine Bandenexpression in erwarteter Höhe (Leonoudakis et al., 2004a; Leonoudakis et al., 2004b), wobei die Aussagekraft durch starke Hintergrundreaktion eingeschränkt ist (Abb. 4.13).

Immunhistologische Färbungen detektieren für das Kir2.2-Kanalprotein unter Verwendung desselben Antikörpers jedoch keine Lokalisation in der Niere. Die Funktionalität des verwendeten Kir2.2-Antikörpers kann an Kryoschnitten von Rattengehirn jedoch durch spezifische Lokalisation eindeutig bestätigt werden.

Kir2.2 im Gehirn

Im Gehirn ist Kir2.2, wie Kir2.1, im Ependym und dem Plexusepithel des Seitenventrikels (Abb. 4.12g) lokalisiert. Stonehouse et al., 1999 bestätigen diesen Befund. Zudem scheint ein typisches Merkmal von Kir2.2 in der Lokalisation in Nervenfaserbündeln, sowohl im Kleinhirn (Abb. 4.12h) als auch im Corpus callosum zu liegen (Abb. 4.12i), was in Einklang mit Immunfärbungen von Prüss et al., 2003 steht. Aufgrund der signifikanten Lokalisation in Nervenfaserbündeln und dem Corpus callosum, der Vernetzung der beiden Großhirnhemisphären, scheint Kir2.2, neben der Aufrechterhaltung des Membranpotentials, in der Signalübertragung des zentralen Nervensystems eine nicht ganz unerhebliche Rolle zu spielen (Thomzig et al., 2003).

Der Proteinnachweis mittels Western Blot (Abb. 4.13), entsprechend Ergebnissen von Prüss et al., 2003; Leonoudakis et al., 2004a; Leonoudakis et al., 2004b und der Nachweis auf RNA-Ebene im Gehirn, entsprechend Karkanis et al., 2003 vervollständigen das Expressionsprofil von Kir2.2 im Gehirn.

Die unterschiedliche Nachweisbarkeit von Kir2.2 in der Niere könnte einerseits auf eine Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinebene hindeuten, andererseits auf eine Diskrepanz zwischen den beiden Methoden des Proteinnachweises mittels Immunhistologie und Western Blot. Dabei ist zu bemerken, daß die RT-PCR zum mRNA-Nachweis gerade wegen ihrer hohen Sensitivität eingesetzt wird.

Da die Untersuchungen mittels Western Blot nicht quantifiziert wurden, kann die Proteinmenge der Kir-Kanäle untereinander nicht verglichen werden, um direkte Rückschlüsse auf die fehlende Lokalisation von Kir2.2, im Gegensatz zu Kir6.1 und Kir2.1 in der Niere ziehen zu können. Die im Western Blot trotz hohem Hintergrund positive Kir2.2-Kanal-Expression in der Niere gegenüber Immunfluoreszenzfärbungen könnte auf die höhere Sensitivität des Western Blot zurückzuführen sein. Die Menge an vorhandenen Kir2.2 Proteinen der Niere befindet sich möglicherweise unter der für die Detektion mit dem Kir2.2-AK in der Immunhistologie nötigen Proteinmenge, wohingegen dieselbe Proteinmenge für das Detektionslevel des Kir2.2-AKs im Western Blot ausreichend ist.

Anzumerken sind Untersuchungen von Leonoudakis et al., 2004b, die im Western Blot eine positive Kanalexpression von Kir2.2 in Gehirn und Niere, entsprechend meinen Ergebnissen, nachweisen konnten. In Zelllinien aus der Niere konnte, im Gegensatz zu Zelllinien aus Neuronen, jedoch kein Kir2.2-Protein-Nachweis erfolgen.

Folglich steht die erstmals nachgewiesene mRNA-Expression von Kir2.2 in den JGZ und der Niere sowie der Western Blot-Nachweis in der Niere in keinem Widerspruch zu der negativen Lokalisation in immunhistologischen Färbungen der Niere.

5.2.2.3 Kir2.3

Kir2.3 wird signifikant im Herzen (Morishige et al., 1994; Tang und Yang, 1994; Liu et al., 2001; Preisig-Müller et al., 1999; Melnyk et al., 2002; Zobel et al., 2003) und im Gehirn (Horio et al., 1996; Prüss et al., 2003) exprimiert. Das Vorkommen im Endothel (Liu et al., 2001; Preisig-Müller et al., 1999), nicht jedoch in der glatten Muskulatur von Gefäßen (Karkanis et al., 2003) wird beschrieben. Aufgrund der ähnlichen Gewebslokalisierung von Kir2.3 mit den Kir2.x-Subtypen wurde Kir2.3 auf die Existenz in den JGZ und der Niere untersucht.

Kir2.3 in JGZ und Niere

Kir2.3 zeigt im Western Blot eine deutliche Expression des Kanal-Proteins (Abb. 4.13) in der Gesamtniere. Eine genaue Lokalisation in den JGZ durch Immunhistologie wurde jedoch nicht durchgeführt. Aufgrund der gemessenen Ströme in den JGZ (Leichtle et al., 2004) sowie aus Untersuchungen an glatten Muskelzellen im Gefäß (Karkanis et al., 2003) ist eine Beteiligung von Kir2.3 (sowie Kir2.4) als alleinige oder beteiligte Untereinheit der Kanäle in den JGZ eher sehr unwahrscheinlich. Beschrieben wird lediglich eine Lokalisation von Kir2.3 in der basolateralen Membran von Epithelzellen der Niere (Le Maout et al., 2001).

Die untersuchte Expression der mRNA von Kir2.3 in den JGZ und der Niere sowie im Gehirn (Abb. 4.18) soll aufgrund einer schlechten Übereinstimmung der verwendeten Primersequenz aus der Maus (Bradley et al., 1999) mit Kir2.3 aus der Ratte (siehe unter 2.5) nicht weiter diskutiert werden. Sie können als Referenzen für eine mögliche Existenz von Kir2.3 nicht herangezogen werden.

Kir2.3 im Gehirn

Im Western Blot zeigt Kir2.3 eine signifikante Expression im Gehirn (Abb. 4.13), entsprechend Falk et al., 1995. Untersuchungen von Inanobe et al., 2002 beschreiben eine spezifische Lokalisation in der postsynaptischen Membran von exzitatorischen Synapsen im Großhirn, was auf eine wichtige Rolle in der synaptischen Übertragung im Großhirn hinweisen könnte. Die spezifische Existenz von Kir2.3 in Neuronen des Striatums, analog zu Kir6.1 in cholinergen Interneuronen (Thomzig et al., 2003), könnte durch Aktivierung oder Hemmung des Kanals interessante neue Möglichkeiten in der Behandlung der Parkinson Erkrankung und für neuroleptischen Therapien darstellen (Prüss et al., 2003).

5.2.2.4 Vorkommen und Pharmakologie des Kir2.x-Kanals in JGZ

Kir 2.x Kanäle sind in ihrer Funktion sehr vielfältig (siehe 1.2.3.1.1). In vielen Zelltypen, v.a. Neuronen und glatten Herzmuskelzellen sowie in den JGZ der Niere, spielen sie eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des zellulären Ruhemembranpotentials und in der Regulierung der Erregbarkeit der Zelle. Auch für die Entwicklungsgeschichte des Organismus (Fischer-Lougheed et al., 2001), die Proliferation und Entwicklung von Zellen (Zaritsky et al., 2000; Zaritsky et al., 2001) sind funktionelle Kir2.x-Kanäle von Bedeutung. So kann die Mutation des Kir2.x-Gens zu diversen Mißbildungen (Zaritsky et al., 2000; Zaritsky et al., 2001) und zum „Andersen-Tawil Syndrom“ (Preisig-Müller et al., 2002) führen. Diese seltene autosomal dominante Erbkrankheit manifestiert sich durch charakteristische kardiale Arrhythmien, periodische Lähmungen, dysmorphen Knochenbau sowie eine Gaumenspalte und andere multiple kraniofasziale Mißbildungen (Andersen et al., 1971; Tawil et al., 1994; Plaster et al., 2001).

In glatten Muskelzellen von Gefäßen haben Kir2.x, v.a. Kir2.1, eine Funktion in der Vasodilatation sowie in der Regulation des Gefäßtonus und des vaskulären Remodelings (Zaritsky et al., 2000; Karkanis et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte der einwärtsgleichrichtende Kaliumstrom in den JGZ der Ratte, aufbauend auf der Arbeit von Kurtz und Penner, 1989, charakterisiert werden. Untersuchungen der Immunhistochemie, der RT-PCR und des Western Blots in diesen Zellen zeigen einen signifikanten Nachweis von Kir2.1 auf Protein- und mRNA-Ebene. Kir2.2 zeigt hingegen kein einheitliches Vorkommen. Auf der mRNA-Ebene ist Kir2.2 in den JGZ eindeutig nachweisbar, zeigt jedoch in der Immunlokalisation kein Vorkommen, bzw. der tatsächlich exprimierte Kir2.2-Kanal befindet sich unter dem Detektionsniveau des Proteins in der Immunhistologie.

Elektrophysiologische Messungen an NaCl-arm und normal ernährten Ratten zeigten, daß die JGZ mit einem starken einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal (Kir) ausgestattet sind (Leichtle et al., 2004). Dieser Kanal zeigte, in Gegenwart von hohen Kaliumkonzentrationen, eine hohe Empfindlichkeit auf eine

Hemmung durch Ba^{2+} und war relativ unempfindlich gegen Cs^+ . In Einzel-Kanal-Aufzeichnungen konnte nur eine Art von Kanal detektiert werden, der eine Einzel-Kanal-Leitfähigkeit von 31,5 pS aufweist.

Die Empfindlichkeit auf eine Hemmung durch Ba^{2+} zeigte die beste Übereinstimmung für Kir2.1, was in Übereinstimmung mit Ergebnissen in glatten Muskelzellen von Gefäßen steht (Robertson et al., 1996). Dafür spricht auch der signifikante Nachweis von Kir2.1 auf Protein- und mRNA-Ebene.

Die schwache Empfindlichkeit des Kanals auf Cs^+ schließt Kir2.2 sowie Kir2.3 als Hauptkomponenten aus, da diese sehr Cs^+ -empfindlich sind (Takahashi et al., 1994; Morishige et al., 1994). Außerdem zeigt Kir2.2 in hyperpolarisiertem Zustand eine Inaktivierung (Takahashi et al., 1994), was nur zu einem kleinen Teil am Beginn der Experimente zu sehen war. Ebenso zeigt Kir2.2 in der molekularen Charakterisierung in den JGZ kein einheitliches Vorkommen. Die Einzel-Kanal-Leitfähigkeit des Kanals von 31,5 pS läßt keine eindeutige Zuordnung einer Kanaluntereinheit zu. Es gibt jedoch Untersuchungen in Meer-schweinchen, in denen für Kir2.1 unter ähnlichen Konditionen ein annähernd gleicher Wert beschrieben wird (Liu et al., 2001).

Der hier beschriebene Nachweis von Kir2.2 könnte auf mögliche Heteromerbildung von Kir2.1 und Kir2.2 hinweisen (Kubo et al., 2002; Preisig-Müller et al., 2002), die zu einem kleinen Anteil an der Bildung des Kanals beteiligt sein können. Heteromerbildung von Kir2.1 und Kir2.2 werden in Herzmuskelzellen und in glatten Muskelzellen von Gefäßen beschrieben, wobei Kir2.1 die dominierende Rolle einnimmt (Picones et al., 2001; Melnyk et al., 2002; Zaritsky et al., 2000; Karkanis et al., 2003). Überhaupt zeigt der einwärtsgleichrichtende Kanal in JGZ große Ähnlichkeit mit Ergebnissen in glatten Muskelzellen von Gefäßen (Bradley et al., 1999). So kann z.B. ebenfalls eine Beteiligung von Kir2.3 und Kir2.4 (nicht untersucht) aufgrund elektrophysiologischen Untersuchungen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Zusammengefaßt kann anhand der molekularbiologischen und elektrophysiologischen Übereinstimmung angenommen werden, daß Kir2.1 in den JGZ die dominante oder alleinige Kanaluntereinheit ist (eventuell ein kleiner Anteil von Kir2.2), die diesem Strom zugrunde liegt (Leichtle et al., 2004).

Dies steht allerdings in Gegensatz zu Untersuchungen von Friis et al., 2003, die in isolierten JGZ der Ratte keinen einwärtsgerichtenden Kaliumstrom detektieren konnten. In isolierten JGZ der Maus glauben sie hingegen diesen Strom nachweisen zu können (Friis et al., 1999) und die unterschiedliche Spezies als Ursache vermuteten. Die von ihnen für JGZ der Maus gezeigten Ströme sind allerdings sehr viel weniger eindeutig als typischer stark einwärtsgerichtender Strom (I_{K1} des Herzens) zu identifizieren als z.B. die Ströme die Kurtz und Penner, 1989 an afferenten Arteriolen der Maus zeigten. Daher erscheint die Erklärung für die in der Ratte fehlenden (Friis et al., 2003), in der Maus aber vorhandenen Ströme (Kurtz und Penner, 1989; Friis et al., 1999) als Spezies-abhängig nicht mehr zwingend. Dies um so mehr, als Chilton und Loutzenhiser, 2001 einen Ba^{2+} -empfindlichen, einwärtsgerichtenden Kaliumstrom in afferenten Arteriolen der Ratte nachwies. Viel wahrscheinlicher ist, daß der Kir-Strom in isolierten JGZ grundsätzlich fehlt und der Nachweis in der Maus ein Irrtum ist. Ursache hierfür könnte zum einen die Isolation der Zellen mit mehr oder weniger spezifischen Proteasen sein, welche zur Zerstörung der Kir-Kanäle führt. Zum anderen wäre es aber auch möglich, daß der Kir-Strom so prominent nur zu beobachten ist, wenn die auffällige Kopplung der Zellen durch gap-junctions noch intakt ist. Ursache ist auf jeden Fall nicht, die in unseren Experimenten meist verwendete NaCl-arme Haltung der Ratten, da die Kir-Kanäle auch in JGZ von Kontrolltieren nachgewiesen werden konnten.

Es gibt allerdings einen weiteren Aspekt, der bei der Bewertung der Rolle der Kir-Kanäle berücksichtigt werden muß. Die in unseren Experimenten verwendeten Zellen sind relativ stark polarisiert und weisen gegenüber Friis et al., 2003 (-32 mV) ein deutlich negativeres Membranpotential (~ 70 mV) auf. Über die Ursache der Zelldepolarisation nach Zellisolation kann nur spekuliert werden, es ist aber vermutlich wirklich so, daß *in vivo* afferente Arteriolen stärker depolarisiert sind als z.B. von Kurtz und Penner, 1989 oder Russ et al., 1999 gemessen wurde. So wurde in perfundierten Arteriolen ein Membranpotential von nur -40 mV gefunden (Loutzenhiser et al., 1997). Ursache hierfür ist wahrscheinlich das Fehlen des Perfusionsdrucks, der die myogene Antwort (Depolarisation und Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$) auslöst. Als Folge

eines weniger negativen Membranpotentials könnte Kir2.x *in vivo* also eine geringere physiologische Aktivität aufweisen, als die Messungen in drucklosen Systemen vermuten lassen.

Die Blockierung des Kanals mit Ba²⁺ (Loutzenhiser et al., 1997; Leichtle et al., 2004) oder Angiotensin II (Kurtz und Penner, 1989) führt zu einer starken Depolarisation der Zelle und zeigt, daß dieser Strom das Ruhemembranpotential der JGZ bestimmt. Zudem sind JGZ der Ratte mit L-Typ spannungsaktivierten Calcium-Kanälen ausgestattet (Friis et al., 2003) und die zytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration wird als ein (negativer) Hauptregulator in der Reninsekretion beschrieben (Skøtt et al., 1991; Osswald und Quast, 1995; Persson, 2003). Folglich ist das funktionelle Vorkommen des nachgewiesenen Kanals direkt an der Regulation der Reninsekretion beteiligt und elementar für die Homöostase des Salz- und Wasserhaushaltes und die Regulation des Blutdrucks.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) ist neben dem Sympathikus das wichtigste Effektorsystem zur Regulation des Blutdrucks sowie des Salz- und Wasserhaushalts im Organismus. Die Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems wird über die Sekretionsrate des Renins gesteuert, die ihrerseits von verschiedenen Regulationsmechanismen und einer Vielzahl von Faktoren kontrolliert wird. Renin wird hauptsächlich in den juxtaglomerulären Zellen (JGZ) der Niere gebildet und gespeichert. Diese Zellen befinden sich in der Media der afferenten Arteriole nahe des Gefäßpols und können sich in glatte Muskelzellen umwandeln und *vice versa*. Um die Anzahl der JGZ zu erhöhen, wurden NaCl-arm ernährte Ratten verwendet, so daß mehr als 90 % der afferenten Arteriolen am distalen Ende der Arteriole reninpositiv war.

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekulare Identität und die Lokalisation von 2 Arten einwärtsgerichteter Kaliumkanäle (Kir) untersucht, zum einen die starken Gleichrichter, welche für das Ruhemembranpotential (ca. -60 mV) in JGZ verantwortlich sind, zum anderen die metabolisch regulierten und pharmakologisch wichtigen vaskulären K_{ATP} -Kanäle.

Um ein möglichst aussagekräftiges Expressionsprofil zu erstellen, wurden die Kir-Kanäle auf RNA- und Proteinebene untersucht. Die genaue Lokalisation des Proteins in den JGZ erfolgte durch immunhistochemische Färbungen an Kryoschnitten der Niere und wurde durch den Nachweis des Kanalproteins in der Niere mittels Western Blotting ergänzt. Der Nachweis der mRNA des jeweiligen Kanals erfolgte mittels semiquantitativer RT-PCR. Untersuchungen im Gehirn dienten als Positivkontrolle.

Kir6.1, die α -Untereinheit des vaskulären K_{ATP} -Kanals, konnte erstmals in JGZ der Rattenniere mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden. Der Nachweis des Proteins konnte im Western Blot bestätigt werden.

Immunhistologische Untersuchungen konnten die Lokalisation von Kir2.1, jedoch nicht von Kir2.2, in der Media der afferenten Arteriole zeigen. Der Proteinnachweis im Western Blot zeigt für Kir2.1 und Kir2.2 positive

Bandenexpression in der Niere. In der RT-PCR konnte eine mRNA-Expression von Kir2.1 und Kir2.2 in den JGZ und der Niere nachgewiesen werden.

Die nachgewiesene molekulare Identität der Kaliumkanäle zeigt, daß Kir2.1 und Kir2.2, die dem einwärtsgleichrichtenden Strom in JGZ zugrunde liegen könnten, dort auch vorkommen. Die Immunhistochemie und elektrophysiologische Untersuchungen weisen allerdings darauf hin, daß Kir2.1 die dominante oder alleinige Kanaluntereinheit ist (Leichtle et al., 2004). Ein kleiner Anteil von Kir2.2 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Der Strom, der durch diese Kanäle getragen wird, spielt eine dominierende Rolle in der Aufrechterhaltung des Membranpotentials der JGZ und trägt über die Modulation der Reninsekretion zur Regulation des Blutdrucks bei.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adrian R (1969) Rectification in muscle membrane. *Prog Biophys Mol Bio* **19**:340-369.
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement IV JP, Boyd III AE, Gonzáles G, Herrera-Soza H, Nguy K, Bryan J und Nelson DA (1995) Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**:423-426.
- Albinus M, Finkbeiner E, Sosath B und Osswald H (1998) Isolated superfused juxtaglomerular cells from rat kidney: a model for study of renin secretion. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **275**:F991-F997.
- Andersen ED, Krasilnikoff PA und Overvad H (1971) Intermittent muscular weakness, extrasystoles, and multiple developmental anomalies. A new syndrome? *Acta Paediatr Scand* **60**:559-564.
- Anzai N, Izumida I, Inagaki N, Seino S und Kawahara K (1997) Expression of uKATP-1 (Kir6.1) in neonatal rat kidney proximal tubule. *Jpn J Physiol* **47 Suppl 1**:S10-S11.
- Ashcroft FM und Gribble FM (1999) ATP-sensitive K^+ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* **42**:903-919.
- Ashcroft FM und Gribble FM (1998) Correlating structure and function in ATP-sensitive K^+ channels. *Trends Neurosci* **21**:288-294.
- Ashcroft SJH und Ashcroft FM (1990) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal* **2**:197-214.
- Babenko AP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L und Bryan J (1998) Reconstituted human cardiac K_{ATP} channels - Functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circ Res* **83**:1132-1143.
- Babenko AP, Gonzalez G und Bryan J (2000a) Pharmacology of sulfonylurea receptors - Separate domains of the regulatory subunits of K_{ATP} channel isoforms are required for selective interaction with K^+ channel openers. *J Biol Chem* **275**:717-720.
- Babenko AP, Gonzalez GC und Bryan J (2000b) Hetero-concatemeric $K_{IR6.X4}/SUR1_4$ channels display distinct conductivities but uniform ATP inhibition. *J Biol Chem* **275**:31563-31566.
- Bendahhou S, Donaldson MR, Plaster NM, Tristani-Firouzi M, Fu Y-H und Ptacek LJ (2003) Defective potassium channel Kir2.1 trafficking underlies Andersen-Tawil syndrome. *J Biol Chem* **278**:51779-51785.
- Bhandari S und Hunter M (2001) Influences of the N- and C-termini of the distal nephron inward rectifier, ROMK. *Kidney Blood Press Res* **24**:142-148.
- Bloch W (1991) A biochemical perspective of the polymerase chain reaction. *Biochem* **30(11)**:2735-2747.
- Bradley KK, Jaggar JH, Bonev AD, Heppner TJ, Flynn ERM, Nelson MT und Horowitz B (1999) $K_{ir2.1}$ encodes the inward rectifier potassium channel in rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol (Lond)* **515**:639-651.
- Brandts B und Pott L (2000) Kaliumströme und die Repolarisation des Herzaktionspotentials. *Physiologie* **15**:10-21.

- Braun GS, Veh RW, Segerer S, Horster MF und Huber SM (2002) Developmental expression and functional significance of Kir channel subunits in ureteric bud and nephron epithelia. *Pflügers Arch -Eur J Physiol* **445**:321-330.
- Bray KM und Quast U (1992) A specific binding site for K⁺ channel openers in rat aorta. *J Biol Chem* **267**:11689-11692.
- Brochiero E, Wallendorf B, Gagnon D, Laprade R und Lapointe J-Y (2002) Cloning of rabbit Kir6.1, SUR2A, and SUR2B: possible candidates for a renal K_{ATP} channel. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **282**:F289-F300.
- Brugnara C, Gee B, Armsby CC, Kurth S, Sakamoto M, Rifai N, Alper SL und Platt OS (1996) Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest* **97**:1227-1234.
- Buchheit KH, Manley PW, Quast U, Russ U, Mazzoni L und Fozard JR (2002) KCO912: a potent and selective opener of ATP-dependent potassium (K_{ATP}) channels which suppresses airways hyperreactivity at doses devoid of cardiovascular effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **365**:220-230.
- Bührle CP, Nobiling R, Mannek E, Schneider D, Hackenthal E und Taugner R (1984) The afferent glomerular arteriole: immunocytochemical and electrophysiological investigations. *J Cardiovasc Pharmacol* **6**:S383-S393.
- Bührle CP, Scholz H, Hackenthal E, Nobiling R und Taugner R (1986) Epithelioid cells: membrane potential changes induced by substances influencing renin secretion. *Mol Cell Endocrin* **45**:37-47.
- Bührle CP, Nobiling R und Taugner R (1985) Intracellular recordings from renin-positive cells of the afferent glomerular arteriole. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **249**:F272-F281.
- Butler A, Wei AG, Baker K und Salkoff L (1989) A family of putative potassium channel genes in Drosophila. *Science* **243**:943-947.
- Cantin M, Araujo-Nascimento M-F, Benchimol S und Desormeaux Y (1977) Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, and arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. An ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study. *Am J Pathol* **87**:581-602.
- Catterall WA (1992) Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol Rev* **72/4**:S15-S48.
- Chilton L und Loutzenhiser R (2001) Functional evidence for an inward rectifier potassium current in rat renal afferent arterioles. *Circ Res* **88**:152-158.
- Churchill PC (1985) Second messengers in renin secretion. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **249**:F175-F184.
- Chutkow WA, Makielski JC, Nelson DJ, Burant CF und Fan Z (1999) Alternative splicing of *sur2* exon 17 regulates nucleotide sensitivity of the ATP-sensitive potassium channel. *J Biol Chem* **274**:13656-13665.
- Chutkow WA, Samuel V, Hansen PA, Pu J, Valdivia CR, Makielski JC und Burant CF (2001) Disruption of *Sur2*-containing K_{ATP} channels enhances insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:11760-11764.

- Clement IV JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L und Bryan J (1997) Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. *Neuron* **18**:827-838.
- Clontech Lab.Inc. (1993) *PCR-Methods and applications*Palo Alto, USA.
- Cook DL und Hales CN (1984) Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**:271-273.
- Cooper EC und Jan LY (1999) Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects, and challenges. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:4759-4766.
- Della Bruna R, Pinet F, Corvol P und Kurtz A (1991) Regulation of renin secretion and renin synthesis by second messengers in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Cell Physiol Biochem* **1**:98-110.
- Derst C, Karschin C, Wischmeyer E, Hirsch JR, Preisig-Müller R, Rajan S, Engel H, Grzeschik K-H, Daut J und Karschin A (2001) Genetic and functional linkage of Kir5.1 and Kir2.1 channel subunits. *FEBS Lett* **491**:305-311.
- Doupnik CA, Davidson N und Lester HA (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr Op Neurobiol* **5**:268-277.
- Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT und MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: Molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* **280**:69-77.
- Eaton MJ, Skatchkov SN, Brune A, Biedermann B, Veh RW und Reichenbach A (2002) SUR1 and Kir6.1 subunits of K(ATP)-channels are co-localized in retinal glial (Muller) cells. *Neuroreport* **13**:57-60.
- Eckman DM und Nelson MT (2001) Potassium ions as vasodilators: role of inward rectifier potassium channels. *Circ Res* **88**:132-133.
- Edwards G und Weston AH (1994) Effect of potassium channel modulating drugs on isolated smooth muscle., in *Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 111* (Szekeres LJ und Papp G eds) pp 469-531, Springer, Heidelberg.
- Falk T, Meyerhof W, Corrette BJ, Schafer J, Bauer CK, Schwarz JR und Richter D (1995) Cloning, functional expression and mRNA distribution of an inwardly rectifying potassium channel protein. *FEBS Lett* **367**:127-131.
- Ferguson MW (1988) Palate development. *Development* **103 Suppl**:41-60.
- Ferrier CP, Kurtz A, Lehner P, Shaw SG, Pusterla C, Saxenhofer H und Weidmann P (1989) Stimulation of renin secretion by potassium-channel activation with cromakalim. *Eur J Clin Pharmacol* **36**:443-447.
- Fink M, Duprat F, Heurteaux C, Lesage F, Romey G, Barhanin J und Lazdunski M (1996) Dominant negative chimeras provide evidence for homo and heteromultimeric assembly of inward rectifier K^+ channel proteins via their N-terminal end. *FEBS Lett* **378**:64-68.
- Fischer-Lougheed J, Liu JH, Espinos E, Mordasini D, Bader CR, Belin D und Bernheim L (2001) Human myoblast fusion requires expression of functional inward rectifier Kir2.1 channels. *J Cell Biol* **153**:677-686.
- Fishman MC (1976) Membrane potential of juxtaglomerular cells. *Nature* **260**:542-544.

- Forssmann WG und Taugner R (1977) Studies on the juxtaglomerular apparatus. V. The juxtaglomerular apparatus in *Tupaia* with special reference to intercellular contacts. *Cell Tissue Res* **177**:291-305.
- Friis UG, Jensen BL, Aas JK und Skøtt O (1999) Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells. *Circ Res* **84**:929-936.
- Friis UG, Jørgensen F, Andreasen D, Jensen BL und Skøtt O (2003) Molecular and functional identification of cyclic AMP-sensitive BK_{Ca} potassium channels (ZERO variant) and L-type voltage-dependent calcium channels in single rat juxtaglomerular cells. *Circ Res* **93**:213-220.
- Gattone VH, Luft FC und Evan AP (1984) Renal afferent and efferent arterioles of the rabbit. *Am J Physiol* **247**:F219-F228.
- Gögelein H, Englert HC, Kotzan A, Hack R, Lehr K-H, Seiz W, Becker RHA, Sultan E, Schölkens BA und Busch AE (2000) HMR 1098: An inhibitor of cardiac ATP-sensitive potassium channels. *Cardiovasc Drug Rev* **18**:157-174.
- Goldstein SAN, Bayliss DA, Desir GV, Kim D, Lazdunski M, Lesage F und O'Kelly I (2002) Potassium channels K_{2P}, in *The IUPHAR compendium of voltage-gated ion channels* (Catterall WA, Chandy KG und Gutman GA eds) pp 173-189, IUPHAR Media, Leeds, UK.
- Gutman GA und Chandy KG (1993) Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Seminars in The Neurosciences* **5**:101-106.
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D und Taugner R (1990) Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* **70**:1067-1116.
- Hackenthal E, Metz R, Bührle CP und Taugner R (1987) Intrarenal and intracellular distribution of renin and angiotensin. *Kidney Int* **31 Suppl.** **20**:S4-S17.
- Hagiwara S und Jaffe LA (1979) Electrical properties of egg cell membranes. *Annu Rev Biophys Bioeng* **8**:385-416.
- Hambrock A, Löffler-Walz C, Kloor D, Delabar U, Horio Y, Kurachi Y und Quast U (1999) ATP-Sensitive K⁺ channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: opposite effects of MgADP. *Mol Pharmacol* **55**:832-840.
- Hambrock A, Preisig-Müller R, Russ U, Piehl A, Hanley PJ, Ray J, Daut J, Quast U und Derst C (2002) Four novel splice variants of sulfonylurea receptor 1. *Am J Physiol (Cell Physiol)* **283**:C587-C598.
- Harding MW und Handschumacher RE (1988) Cyclophilin, a primary molecular target for cyclosporine. Structural and functional implications. *Transplantation* **46**:29S-35S.
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV und Hebert SC (1993) Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* **362**:31-38.
- Hodgkin AL, Huxley AF und Katz B (1952) Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol (Lond)* **116**:424-448.
- Horio Y, Morishige K, Takahashi N und Kurachi Y (1996) Differential distribution of classical inwardly rectifying potassium channel mRNAs in the brain: comparison of IRK2 with IRK1 and IRK3. *FEBS Lett* **379**:239-243.

- Hoyer JR, Sisson SP und Vernier RL (1979) Tamm-Horsfall glycoprotein: Ultrastructural immunoperoxidase localization in rat kidney. *Lab Invest* **41**:168-173.
- Huber SM, Braun GS, Segerer S, Veh RW und Horster MF (2000) Metanephrogenic mesenchyme-to-epithelium transition induces profound expression changes of ion channels. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **279**:F65-F76.
- Inagaki N, Gonoi T, Clement IV JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S und Bryan J (1995a) Reconstitution of I_{KATP} : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**:1166-1170.
- Inagaki N, Gonoi T, Clement IV JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J und Seino S (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels. *Neuron* **16**:1011-1017.
- Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gonoi T, Horie M, Seino Y, Mizuta M und Seino S (1995b) Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem* **270**:5691-5694.
- Inanobe A, Fujita A, Ito M, Tomoike H, Inageda K und Kurachi Y (2002) Inward rectifier K^+ channel Kir2.3 is localized at the postsynaptic membrane of excitatory synapses. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**:C1396-C1403.
- Inoue I, Nagase H, Kishi K und Higuti T (1991) ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* **352**:244-247.
- Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y und Kurachi Y (1996) A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (KIR6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K^+ channel. *J Biol Chem* **271**:24321-24324.
- Isomoto S, Kondo C und Kurachi Y (1997) Inwardly rectifying potassium channels: Their molecular heterogeneity and function. *Jpn J Physiol* **47**:11-39.
- Isomoto S und Kurachi Y (1997) Function, regulation, pharmacology, and molecular structure of ATP-sensitive K^+ channels in the cardiovascular system. *J Cardiovasc Electrophysiol* **8**:1431-1446.
- Jensen BL, Gambaryan S, Scholz H und Kurtz A (1998) K_{ATP} channels are not essential for pressure-dependent control of renin secretion. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **435**:670-677.
- Kamb A, Iverson LE und Tanouye MA (1987) Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell* **50**:405-413.
- Kane GC, Behfar A, Yamada S, Perez-Terzic C, O'Coilain F, Reyes S, Dzeja PP, Miki T, Seino S und Terzic A (2004) ATP-Sensitive K^+ Channel Knockout Compromises the Metabolic Benefit of Exercise Training, Resulting in Cardiac Deficits. *Diabetes* **53 Suppl 3**:S169-S175.
- Karkanis T, Li S, Pickering JG und Sims SM (2003) Plasticity of K_{IR} channels in human smooth muscle cells from internal thoracic artery. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* **284**:H2325-H2334.
- Karschin A, Wischmeyer E, Döring F und Karschin C (1997) Kalium-Einwärtsgleichrichter - ursprüngliche Kanalstrukturen als Basis funktioneller Vielfalt. *Neuroforum* **4** **197**:127-132.

- Katz B (1949) Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* **3**:258-299.
- Keren-Raifman T, Ivanina T, Bismuth Y und Dascal N (2000) Expression cloning of KCRF, a potassium channel regulatory factor. *Biochem Biophys Res Commun* **274**:852-858.
- Kloor D, Stumvoll W, Schmid H, Kömpf J, Mack A und Osswald H (2000) Localization of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the rat kidney. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **48**:211-218.
- Köhler T, Laßner D, Rost A, Thamm B, Pustowoit B und Remke H (1995) *Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction. Nonradioactive PCR Methods* Berlin Heidelberg.
- Kondo C, Takahashi N, Isomoto S, Yamada M and Kurachi Y (1995) Channel activity in *Xenopus* oocytes by coinjecting cRNAs from various inwardly rectifying K⁺ channel clones. *J Mol Cell Cardiol* **27**:A529.
- Koushanpour E und Kriz W (1986) *Renal physiology: principles, structure, and function*, Springer-Verlag, New York.
- Kreisberg JI, Hoover RL und Karnovsky MJ (1978) Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells in vitro. *Kidney Int* **14**:21-30.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Lester HA, Nichols CG, Seino S und Vandenberg CA (2002) Potassium channels K_{ir}, in *The IUPHAR compendium of voltage-gated ion channels* (Catterall WA, Chandy KG und Gutman GA eds) pp 154-171, IUPHAR Media, Leeds, UK.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN und Jan LY (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**:127-133.
- Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilschifter J und Bauer C (1988) Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release. *Kidney Int* **33**:798-803.
- Kurtz A (1989) Cellular control of renin secretion. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **113**:1-40.
- Kurtz A, Hamann M und Götz K (2000) Role of potassium channels in the control of renin secretion from isolated perfused rat kidneys. *Pflügers Arch -Eur J Physiol* **440**:889-895.
- Kurtz A und Penner R (1989) Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:3423-3427.
- Kurtz A, Skøtt O, Chegini S und Penner R (1990) Lack of direct evidence for a functional role of voltage-operated calcium channels in juxtaglomerular cells. *Pflügers Arch -Eur J Physiol* **416**:281-287.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Laske-Ernst JK (2003) *Einfluss von Botenstoffen auf die freie Calciumkonzentration in reninsezernierenden Zellen von Ratten und Mäusen*, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Doktorarbeit
- Le Maout S, Welling PA, Brejon M, Olsen O und Merot J (2001) Basolateral membrane expression of a K⁺ channel, Kir 2.3, is directed by a cytoplasmic COOH-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:10475-10480.

- Lee K, Dixon AK, Richardson PJ und Pinnock RD (1999) Glucose-receptive neurones in the rat ventromedial hypothalamus express K_{ATP} channels composed of Kir6.1 and SUR1 subunits. *J Physiol (Lond)* **515**:439-452.
- Leichtle A, Rauch U, Albinus M, Benohr P, Kalbacher H, Mack AF, Veh RW, Quast U und Russ U (2004) Electrophysiological and molecular characterization of the inward rectifier in juxtaglomerular cells from rat kidney. *J Physiol (Lond)* **560**:365-376.
- Leonoudakis D, Conti LR, Anderson S, Radeke CM, McGuire LMM, Adams ME, Froehner SC, Yates JR und Vandenberg CA (2004a) Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *J Biol Chem* **279**:22331-22346.
- Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LMM und Vandenberg CA (2004b) A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J Biol Chem* **279**:19051-19063.
- Linseman DA, Lawson JA, Jones DA und Ludens JH (1995) Glyburide attenuates calmodulin antagonist-stimulated renin release from isolated mouse juxtaglomerular cells. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **269**:F242-F247.
- Liss B und Roeper J (2001) Molecular physiology of neuronal K-ATP channels. *Molecular Membrane Biology* **18**:117-127.
- Liu GX, Derst C, Schlichthörl G, Heinen S, Seeböhm G, Bruggemann A, Kummer W, Veh RW, Daut J und Preisig-Müller R (2001) Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K^+ channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol (Lond)* **532**:115-126.
- Lorenz JN, Weihprecht H, He X-R, Skøtt O, Briggs JP und Schnermann J (1993) Effects of adenosine and angiotensin on macula densa-stimulated renin secretion. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **265**:F187-F194.
- Loutzenhiser R, Chilton L und Trottier G (1997) Membrane potential measurements in renal afferent and efferent arterioles: actions of angiotensin II. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **273**:F307-F314.
- Malhi H, Irani AN, Rajvanshi P, Suadican SO, Spray DC, McDonald TV und Gupta S (2000) K_{ATP} channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines - Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. *J Biol Chem* **275**:26050-26057.
- Masilamani S, Wang X, Kim G-H, Brooks H, Nielsen J, Nielsen S, Nakamura K, Stokes JB und Knepper MA (2002) Time course of renal Na-K-ATPase, NHE3, NKCC2, NCC, and ENaC abundance changes with dietary NaCl restriction. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **283**:F648-F657.
- Mederos y Schnitzler M, Derst C, Daut J und Preisig-Müller R (2000) ATP-sensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart. *J Physiol (Lond)* **525**:307-317.
- Melnyk P, Zhang L, Shrier A und Nattel S (2002) Differential distribution of Kir2.1 and Kir2.3 subunits in canine atrium and ventricle. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* **283**:H1123-H1133.

- Metzger F, Löffler C und Quast U (1997) Sulphonylurea binding in rat isolated glomeruli: pharmacological characterization and dependence on cell metabolism and cytoskeleton. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **355**:141-149.
- Metzger F und Quast U (1996) Binding of [³H]-P1075, an opener of ATP-sensitive K⁺ channels, to rat glomerular preparations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **354**:452-459.
- Morishige KI, Takahashi N, Jahangir A, Yamada M, Koyama H, Zanelli JS und Kurachi Y (1994) Molecular cloning and functional expression of a novel brain specific inward rectifier potassium channel. *FEBS Lett* **346**:251-256.
- Nichols CG und Lederer WJ (1991) Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* **261**:H1675-H1686.
- Nichols CG und Lopatin AN (1997) Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* **59**:171-191.
- Noma A (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* **305**:147-148.
- Oonuma H, Iwasawa K, Iida H, Nagata T, Imuta H, Morita Y, Yamamoto K, Nagai R, Omata M und Nakajima T (2002) Inward rectifier K⁺ current in human bronchial smooth muscle cells: inhibition with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**:371-379.
- Osswald H und Quast U (1995) Ion channels and renin secretion from juxtaglomerular cells, in *The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells* (Scherübl H und Hescheler J eds) pp 301-314, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Persson PB (2003) Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol (Lond)* **552**:667-671.
- Pessia M, Tucker SJ, Lee K, Bond CT und Adelman JP (1996) Subunit positional effects revealed by novel heteromeric inwardly rectifying K⁺ channels. *EMBO J* **15**:2980-2987.
- Pfaff IL, Wagner H-J und Vallon V (1999) Immunolocalization of protein kinase C isoenzymes α , β I and β II in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* **10**:1861-1873.
- Picones A, Keung E und Timpe LC (2001) Unitary conductance variation in Kir2.1 and in cardiac inward rectifier potassium channels. *Biophys J* **81**:2035-2049.
- Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL, Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu Y-H und Ptacek LJ (2001) Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* **105**:511-519.
- Pratz J, Mondat S, Montier F und Cavero I (1991) Effects of the K⁺ channel activators, RP 52891, cromakalim and diazoxide, on the plasma insulin level, plasma renin activity and blood pressure in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **258**:216-222.
- Preisig-Müller R, Mederos y Schnitzler M, Derst C und Daut J (1999) Separation of cardiomyocytes and coronary endothelial cells for cell-specific RT-PCR. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* **46**:H413-H416.
- Preisig-Müller R, Schlichthörl G, Goerge T, Heinen S, Brüggemann A, Rajan S, Derst C, Veh RW und Daut J (2002) Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7774-7779.

- Prüss H, Wenzel M, Eulitz D, Thomzig A, Karschin A und Veh RW (2003) Kir2 potassium channels in rat striatum are strategically localized to control basal ganglia function. *Mol Brain Res* **110**:203-219.
- Quast U (1992) Potassium channel openers: pharmacological and clinical aspects. *Fundam Clin Pharmacol* **6**:279-293.
- Quast U (1993) Do the K⁺ channel openers relax smooth muscle by opening K⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* **14**:332-337.
- Quast U (1996) Effects of potassium channel activators in isolated blood vessels, in *Potassium Channels and their Modulators: From Synthesis to Clinical Experience* (Evans JM, Hamilton TC, Longman SD und Stemp G eds) pp 173-195, Taylor & Francis, London.
- Quast U, Guillon JM und Cavero I (1995) Modulation of K⁺ channels: pharmacological and therapeutic aspects, in *Pharmacological Control of Calcium and Potassium Homeostasis* (Godfraind T und et al. eds) pp 23-42, Kluwer Academic Publishers and Fondazione Giovanni Lorenzini,
- Quast U, Linde C, Löffler C und Metzger F (1996) Modulation of ATP-sensitive K⁺ channels in rat aorta and kidney, in *Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Regulation* (Endoh M, Morad M, Scholz H und Iijima T eds) pp 111-121, Springer (Tokyo),
- Quayle JM, Nelson MT und Standen NB (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* **77**:1165-1232.
- Rauch U (2000) *Untersuchungen zu Lokalisation, intrazellulärer Calciumkonzentration, Membranpotential und sekretorischer Aktivität reninsezernierender Zelle in der afferenten Arteriole der Ratte*, Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Doktorarbeit
- Reimann F und Ashcroft FM (1999) Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Op Cell Biol* **11**:503-508.
- Richer C, Pratz J, Mulder P, Mondot S, Giudicelli JF und Cavero I (1990) Cardiovascular and biological effects of K⁺ channel openers, a class of drugs with vasorelaxant and cardioprotective properties. *Life Sci* **47**:1693-1705.
- Robertson BE, Bonev AD und Nelson MT (1996) Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat coronary arteries: block by Mg²⁺, Ca²⁺, and Ba²⁺. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* **271**:H696-H705.
- Russ, Leichtle, Harsch and Quast (2003a) The membrane potential of renin secreting cells from rat kidney is determined by Kir2.x channels. *Pflügers Arch -Eur J Physiol ; Suppl* **Q 20 - 3**:S45.
- Russ, Leichtle A, Harsch S and Quast (2003b) Kir2.x channels are the decisive component for the membrane potential of renin secreting cells from rat kidney. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **267**:R70.
- Russ U, Rauch U und Quast U (1999) Pharmacological evidence for a K_{ATP} channel in renin-secreting cells from rat kidney. *J Physiol (Lond)* **517**:781-790.
- Sakura H, Trapp S, Liss B und Ashcroft FM (1999) Altered functional properties of K_{ATP} channel conferred by a novel splice variant of SUR1. *J Physiol (Lond)* **521**:337-350.

- Salkoff L, Baker K, Butler A, Covarrubias M, Pak MD und Wei A (1992) An essential 'set' of K⁺ channels conserved in flies, mice and humans. *Trends Neurosci* **15**:161-166.
- Schram G, Melnyk P, Pourrier M, Wang Z und Nattel S (2002) Kir2.4 and Kir2.1 K⁺ channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J Physiol (Lond)* **544**:337-349.
- Seharaseyon J, Sasaki N, Ohler A, Sato T, Fraser H, Johns DC, O'Rourke B und Marban E (2000) Evidence against functional heteromultimerization of the K_{ATP} channel subunits Kir6.1 and Kir6.2. *J Biol Chem* **275**:17561-17565.
- Seino S (1999) ATP-sensitive potassium channels: A model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol* **61**:337-362.
- Seino S und Miki T (2003) Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol* **81**:133-176.
- Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B, Abrahamson DR und Gomez RA (2001) Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **281**:F345-F356.
- Sgard F, Faure C, Drieu-la-Rochelle C, Graham D, O'Connor SE, Janiak P und Besnard F (2000) Regulation of ATP-sensitive potassium channel mRNA expression in rat kidney following ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun* **269**:618-622.
- Skatchkov SN, Rojas L, Eaton MJ, Orkand RK, Biedermann B, Bringmann A, Pannicke T, Veh RW und Reichenbach A (2002) Functional expression of Kir 6.1/SUR1-K(ATP) channels in frog retinal Muller glial cells. *Glia* **38**:256-267.
- Skatchkov SN, Thomzig A, Eaton MJ, Biedermann B, Eulitz D, Bringmann A, Pannicke T, Veh RW und Reichenbach A (2001) Kir subfamily in frog retina: specific spatial distribution of Kir 6.1 in glial (Muller) cells. *Neuroreport* **12**:1437-1441.
- Skøtt O, Salomonsson M, Persson AEG und Jensen BL (1991) Mechanisms of renin release from juxtaglomerular cells. *Kidney Int Suppl* **32**:S16-S19.
- Smith JA, Sivaprasadarao A, Munsey TS, Bowmer CJ und Yates MS (2001) Immunolocalisation of adenosine A(1) receptors in the rat kidney. *Biochem Pharmacol* **61**:237-244.
- Sosath B (1999) *Untersuchungen zur Regulation der Reninsekretion an isolierten superfundierten juxtaglomerulären Zellen der Rattenniere*, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Doktorarbeit
- Spielman WS und Arend L (1991) Adenosine receptors and signaling in the kidney. *Hypertension* **17**:117-130.
- Stonehouse AH, Pringle JH, Norman RI, Stanfield PR, Conley EC und Brammar WJ (1999) Characterisation of Kir2.0 proteins in the rat cerebellum and hippocampus by polyclonal antibodies. *Histochem Cell Biol* **112**:457-465.
- Süßbrich H, Waldegger S, Lang F und Busch AE (1996) Blockade of HERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. *FEBS Lett* **385**:77-80.
- Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S und Takata K (1997) Kir6.1: A possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **241**:693-697.

- Suzuki M, Li RA, Miki T, Uemura H, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Ogura T, Seino S, Marbán E und Nakaya H (2001) Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res* **88**:570-577.
- Szamosfalvi B, Cortes P, Alviani R, Asano K, Riser BL, Zasuwa G und Yee J (2002) Putative subunits of the rat mesangial K_{ATP} : A type 2B sulfonyleurea receptor and an inwardly rectifying K^+ channel. *Kidney Int* **61**:1739-1749.
- Takahashi N, Morishige KI, Jahangir A, Yamada M, Koyama H und Kurachi Y (1994) Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a second class of inward rectifier potassium channels in the mouse brain. *J Biol Chem* **269**:23274-23279.
- Tanemoto M, Vanoye CG, Dong K, Welch R, Abe T, Hebert SC und Xu JZ (2000) Rat homolog of sulfonyleurea receptor 2B determines glibenclamide sensitivity of ROMK2 in *Xenopus laevis* oocyte. *Am J Physiol (Renal Physiol)* **278**:F659-F666.
- Tang W und Yang XC (1994) Cloning a novel human brain inward rectifier potassium channel and its functional expression in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* **348**:239-243.
- Taugner R, Hackenthal E, Rix E, Nobiling R und Poulsen K (1982) Immunocytochemistry of the renin-angiotensin system: renin, angiotensinogen, angiotensin I, angiotensin II and converting enzyme in the kidneys of mice, rats and tree shrews. *Kidney Int Suppl* **12**:S33-S43.
- Taugner R und Hackenthal E (1989) Morphology of the juxtaglomerular apparatus, in *The juxtaglomerular apparatus* pp 5-43, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Tawil R, Ptacek LJ, Pavlakis SG, DeVivo DC, Penn AS, Ozdemir C und Griggs RC (1994) Andersen's syndrome: potassium-sensitive periodic paralysis, ventricular ectopy, and dysmorphic features. *Ann Neurol* **35**:326-330.
- Tempel BL, Papazian DM, Schwarz TL, Jan YN und Jan LY (1987) Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* **237**:770-775.
- Thomzig A, Prüss H und Veh RW (2003) The Kir6.1-protein, a pore-forming channels, is prominently expressed subunit of ATP-sensitive potassium by giant cholinergic interneurons in the striatum of the rat brain. *Brain Res* **986**:132-138.
- Thomzig A, Wenzel M, Karschin C, Eaton MJ, Skatchkov SN, Karschin A und Veh RW (2001) Kir6.1 is the principal pore-forming subunit of astrocyte but not neuronal plasma membrane K-ATP channels. *Molecular and Cellular Neuroscience* **18**:671-690.
- Thorneloe KS, Maruyama Y, Malcolm AT, Light PE, Walsh MP und Cole WC (2002) Protein kinase C modulation of recombinant ATP-sensitive K^+ channels composed of Kir6.1 and/or Kir6.2 expressed with SUR2B. *J Physiol (Lond)* **541**:65-80.
- Tinker A, Jan YN und Jan LY (1996) Regions responsible for the assembly of inwardly rectifying potassium channels. *Cell* **87**:857-868.
- Topert C, Doring F, Wischmeyer E, Karschin C, Brockhaus J, Ballanyi K, Derst C und Karschin A (1998) Kir2.4: a novel K^+ inward rectifier channel associated with motoneurons of cranial nerve nuclei. *J Neurosci* **18**:4096-4105.
- Vallon V, Kirschenmann D, Brenner I, Albinus M und Osswald H (1998) Potassium diet as a determinant for the renal response to systemic potassium channel modulation in anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **358**:245-252.

- Veh RW, Lichtinghagen R, Sewing S, Wunder F, Grumbach IM und Pongs O (1995) Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. *Eur J Neurosci* **7**:2189-2205.
- Wang AM, Doyle MV und Mark DF (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:9717-9721.
- Wang H, Yang B, Zhang L, Xu D und Wang Z (2000) Direct block of inward rectifier potassium channels by nicotine. *Toxicol Appl Pharmacol* **164**:97-101.
- Weaver DR und Reppert SM (1992) Adenosine receptor gene expression in rat kidney. *Am J Physiol* **263**:F991-F995.
- Wible BA, De Biasi M, Majumder K, Tagliatela M und Brown AM (1995) Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K⁺ channel from human atrium. *Circ Res* **76**:343-350.
- Wurfer K, Hackenthal E, Metz R, Nobiling R, Simon T und Taugner R (1988) Interzonal and intrazonal heterogeneities in the renin status of the preglomerular arterioles in five species. *Histochemistry* **89**:283-287.
- Yamada K, Ji JJ, Yuan H, Miki T, Sato S, Horimoto N, Shimizu T, Seino S und Inagaki N (2001) Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science* **292**:1543-1546.
- Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y und Kurachi Y (1997) Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *J Physiol (Lond)* **499**:715-720.
- Yang J, Jan YN und Jan LY (1995) Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron* **15**:1441-1447.
- Yi BA und Jan LY (2000) Structure and Functional Organization of Potassium Channels. *Celltransmissions* **16**:3-14.
- Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T und Sperelakis N (1998) ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol (Cell Physiol)* **43**:C25-C37.
- Yosefy C, Magen E, Kiselevich A, Priluk R, London D, Volchek L und Viskoper R-JJ (2004) Rosiglitazone improves, while Glibenclamide worsens blood pressure control in treated hypertensive diabetic and dyslipidemic subjects via modulation of insulin resistance and sympathetic activity. *J Cardiovasc Pharmacol* **44**:215-222.
- Zaritsky JJ, Eckman DM, Wellman GC, Nelson MT und Schwarz TL (2000) Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K⁺ current in K⁺-mediated vasodilation. *Circ Res* **87**:160-166.
- Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL und Schwarz TL (2001) The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K⁺ current (I_{K1}) as revealed by the targeted deletion of the murine *Kir2.1* and *Kir2.2* genes. *J Physiol (Lond)* **533**:697-710.
- Zhou M, Tanaka O, Sekiguchi M, Sakabe K, Anzai M, Izumida I, Inoue T, Kawahara K und Abe H (1999) Localization of the ATP-sensitive potassium channel subunit (Kir6. 1/uK(ATP)-1) in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **74**:15-25.

- Zobel C, Cho HC, Nguyen T-T, Pekhletski R, Diaz RJ, Wilson GJ und Backx PH (2003) Molecular dissection of the inward rectifier potassium current (I_{K1}) in rabbit cardiomyocytes: evidence for heteromeric co-assembly of $K_{ir2.1}$ and $K_{ir2.2}$. *J Physiol (Lond)* **550**:365-372.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. U. Quast und PD. Dr. U. Russ am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard Karls Universität Tübingen durchgeführt.

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die diese interdisziplinäre Dissertation ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben. Im Besonderen:

Herrn Prof. Dr. Ulrich Quast danke ich herzlich für die interessante, herausfordernde Aufgabenstellung und für die freundliche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit. Für die großzügigen Freiräume bei der Durchführung meiner Arbeit bin ich ihm sehr dankbar.

Herrn PD Dr. Ulrich Russ danke ich besonders für die ausdauernde und tatkräftige Betreuung während der gesamten Arbeit. Er war unmittelbarer Ansprechpartner bei allen Fragen und Problemen. Seine wissenschaftlichen und PC-technischen Ratschläge sowie sein Ideenreichtum waren ein entscheidender Beitrag zu meiner Arbeit.

Herrn Dr. Andreas Mack vom Anatomischen Institut, Universität Tübingen möchte ich für die Einweisung sowie seine kompetenten anatomischen und technischen Ratschläge beim Erstellen meiner Fluoreszenzbilder am Laser Scanning Mikroskop bedanken.

Herrn Professor Dr. Rüdiger Veh vom Institut für Anatomie der Charité, Berlin danke ich für das Bereitstellen der Antikörper sowie seine Unterstützung (Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft; VE 187/1-3).

Herrn Dr. Hubert Kalbacher, Physiologisch-chemisches Institut, Universität Tübingen und seinem gesamten Team danke ich für die humorvolle und effektive Zusammenarbeit im „Berghof“, ob dem Himmelreich 7.

Frau Dr. Regina Preisig-Müller, Institut für Normale und Pathologische Physiologie, Universität Marburg danke ich für den schnellen, unkomplizierten wissenschaftlichen Austausch.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Simone Harsch für die herzliche und humorvolle Betreuung, ihre wertvolle und motivierende Unterstützung sowie die Möglichkeit, im Labor „auf dem Berghof“ die Experimente mittels Western-Blot durchführen zu dürfen. Danken möchte ich an dieser Stelle auch Frau Proksch.

Bei Herrn Dr. Peter Benöhr und Elke Malenke möchte ich mich für die Einweisung in das molekularbiologische Arbeiten mittels RT-PCR bedanken.

Frau PD. Dr. Doris Kloor und Frau Dr. Imke Pfaff danke ich ganz herzlich für das Erlernen der unterschiedlichen Methoden der Organentnahmen und Färbemethoden sowie der kompetenten Beratung.

Frau PD. Dr. Margitta Albinus danke ich für ihre freundlichen Ratschläge sowie für das Überlassen von isolierten reninsezernierenden Zellen.

Frau Dr. Annette Hambrock möchte ich für interessante wissenschaftliche Gespräche und eine gute Zusammenarbeit ob dem Himmelreich danken.

Herrn Dr. Ulrich Rauch danke ich für seine stetige Bereitschaft Problemstellungen auch von „extern“ zu klären.

Frau Cornelia Walz, Frau Dr. Julia Laske-Ernst und Dr. Ulf Lange danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre, die unermüdliche Gesprächsbereitschaft sowie ihre moralische Begleitung.

Herrn Damian Stefan, Herrn Jochen Lichtenberg, Herrn Alexander Stehle, Herrn Markus Winkler, Frau Eva Stauß, Herrn Holger Felsch und Herrn Alexander Klein danke ich für das harmonische Miteinander im Labor.

Herrn Marc Chmielnicki danke ich für das Überlassen seiner Abbildung.

Weiterhin danke ich auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard-Karl-Universität Tübingen für die Unterstützung und Zusammenarbeit.

Herrn Jörg Lonkwitz, Frau Olga Maksimovic und Herrn Matthias Krusch möchte ich für das Korrekturlesen und für die Problemlösungen der Graphikprogramme danken.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern sowie meinen zwei Brüdern für den uneingeschränkten Rückhalt, ihr Verständnis und die Förderung während meines Werdegangs.

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Veröffentlichungen:

- Leichtle A, Rauch U, Albinus M, Benohr P, Kalbacher H, Mack AF, Veh RW, Quast U und Russ U (2004) Electrophysiological and molecular characterization of the inward rectifier in juxtaglomerular cells from rat kidney. *J Physiol (Lond)* **560**:365-376.
- Russ, Leichtle, Harsch and Quast (2003a) The membrane potential of renin secreting cells from rat kidney is determined by Kir2.x channels. *Pflügers Arch -Eur J Physiol ; Suppl Q* **20 - 3**:S45.
- Russ, Leichtle A, Harsch S and Quast (2003b) Kir2.x channels are the decisive component for the membrane potential of renin secreting cells from rat kidney. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **267**:R70.

Poster:

- U. Russ, A. Leichtle, U. Rauch und U. Quast: Inwardly rectifying K⁺-channels in renin secreting cells. 4. IZKF-Symposium, Tübingen 2001.
- U. Russ, A. Leichtle, R.W. Veh und U. Quast: Inwardly rectifying K⁺-channels in the afferent arteriole of rat kidney. Wissenschaftstreffen 2001 von Schwerpunktprogrammen der DFG, Berlin 2001.
- U. Russ, A. Leichtle, U. Rauch, M. Albinus und U. Quast Inwardly rectifying K⁺-channels in the afferent arteriole of rat kidney. Symposium Molekulare, experimentelle und klinische Pharmakologie der Niere, Tübingen 2001.

Vortrag:

- Kaliumkanäle, Rezeptoren und intrazelluläre Kalziumkonzentration in reninsezernierenden Zellen des Vas afferens der Rattenniere (2001), Lothar-Meyer-Bau, Tübingen.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name	Anke Leichtle
Geboren	08.04.1974
Geburtsort	Ehingen (Donau)
Familienstand	ledig

Ausbildung

1986 – 1993	Gymnasium Ehingen, Ehingen (Donau)
1993 – 1994	Studium der Romanistik an der Universität Caen, Frankreich
1994 – 1997	Studium der Romanistik und Sportwissenschaften an der Universität Konstanz
1997 – 2004	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität, Tübingen

Examina

04/1999	Ärztliche Vorprüfung
08/2000	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (12/11/2004)

Promotionsarbeit

seit 05/2001	Titel: Molekulare Charakterisierung von einwärtsgerichtenden Kaliumkanälen (Kir) in reninsezernierenden Zellen in der afferenten Arteriole der Rattenniere; unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. U. Quast und Herrn PD. Dr. U. Russ am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen; Abteilung Molekularpharmakologie.
--------------	---