

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die segmentspezifische Lokalisation von Kir4.1, THIK-1 und THIK-2 Kaliumkanälen in der Säugerniere

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Von

Irena Goranova
aus Vratsa, Bulgarien

Datum der Promotion: 10.03.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Zusammenfassung (auf Deutsch).....	6
Abstract (auf Englisch).....	8
1 Einleitung	10
1.1 Kaliumfunktion und –regulation im Körper.....	10
1.2 Organisation und Funktion des Nephrons.....	11
1.3 <i>Inward rectifier</i> K ⁺ -Kanäle und Kir4.1.....	13
1.4 2-Poren-K ⁺ -Kanäle und THIK-1 und THIK-2.....	14
1.5 Zielsetzung.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Versuchstiere und Perfusionsfixierung.....	16
2.2 Zellkultur.....	16
2.3 Gewebeprozessierung.....	16
2.3.1 Gewebeprozessierung für Immunhistochemie und In situ Hybridisierung.....	16
2.3.2 Gewebeprozessierung für Immunblotting.....	17
2.4 Immunhistochemie.....	17
2.4.1 Primär- und Sekundärantikörper.....	17
2.4.2 Antikörperinkubation und Antikörperdetektion.....	18
2.4.2.1 Immunfluoreszenz.....	18
2.4.2.2 Preembedding.....	18
2.5 Western Blot.....	19
2.6 PCR.....	20
2.7 In situ Hybridisierung mit nicht-radioaktivem Detektionssystem.....	21
2.7.1 Präparation der cDNS.....	21
2.7.2 In vitro-Transkription zur Herstellung Digoxigenin-markierter Riboproben.....	21
2.7.3 Hybridisierung Digoxigenin-markierter Riboproben.....	22
2.7.4 Waschschritte zur Entfernung nicht hybridisierter Riboproben.....	22
2.7.5 Detektion der hybridisierten Riboproben.....	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Lokalisation von Kir 4.1 in der Mausniere	24
3.2 Lokalisation von THIK-1.....	28
3.2.1 THIK-1 Verteilung in der Maus- und Rattenniery.....	28

3.2.2 Lokalisation von THIK-1 in OK-Zellen.....	29
3.3 Lokalisation von THIK-2 in der Maus- und Rattenniere.....	31
4 Diskussion.....	36
4.1 Expression und Funktion von Kir4.1.....	36
4.2 Expression und Funktion von THIK-1 und THIK-2.....	39
Literaturverzeichnis.....	43
KARGER PUBLISHERS LICENSE.....	49
Eidesstattliche Versicherung.....	51
Lebenslauf.....	53
Publikationsliste.....	54
Danksagung.....	55

Abkürzungsverzeichnis

ADH	antidiuretisches Hormon
AQP2/3/4	Aquaporin 2/3/4
ATL	<i>thin ascending limb</i> , dünne Teil der aufsteigenden Henle'schen Schleife
ATP	Adenosintriphosphat
CD	<i>collecting duct</i> , Sammelrohr
CCD	<i>cortical CD</i> , kortikales Sammelrohr
cDNA	<i>copy DNA</i> , Kopie DNA
CNT	<i>connecting tubule</i> , Verbindungsstück
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4,6-diamino-2-Phenylindol
DCT	<i>distal convoluted tubule</i> , distaler Konvolut
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle's medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTL	<i>thin descending limb</i> , dünne Teil der absteigenden Henle'schen Schleife
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENaC	epithelialer Na ⁺ -Kanal
EAST	<i>epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, salt-wasting tubulopathy</i> ; Epilepsie, Ataxie, sensorineurale Schwerhörigkeit, Tubulopathie, die zu einem Salzverlust führt
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GST	Glutathion-S-Transferase
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
KG	Körpergewicht
Kir	K ⁺ - <i>inward rectifier</i>
MCD	<i>medullary CD</i> , medulläres Sammelrohr
MD	Macula densa
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat

NCC	Na ⁺ -Cl ⁻ -Kotransporter
NGS	<i>normal goat serum</i> , normales Ziegenserum
NKCC2	Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Kotransporter
OK	<i>opossum kidney</i> , Opossumniere
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PT	<i>proximale tubule</i> , proximaler Tubulus
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>reverse transcription-PCR</i> , reverse Transkriptase PCR
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SeSAME	<i>seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, electrolyte imbalance</i> Anfälle, sensoneurale Schwerhörigkeit, Aaxie, mentale Retardierung, Dysbalance der Elektrolyte
SSC	<i>standard sodium citrat</i> , NaCl-Citrat Puffer
TAL	<i>thick ascending limb of Henle</i> , dicker aufsteigender Schenkel der Henle'schen Schleife
TGF	tubuloglomerulärer Feedbackmechanismus
THIK	<i>tandem pore domain halothane inhibited K⁺ channel</i>
THP	Tamm Horsfall Protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Zusammenfassung (deutsch)

Einleitung: Beeinträchtigungen der Kaliumhomöostase gehören zu den häufigsten Elektrolytstörungen überhaupt und können neben neurologischen Symptomen und kardialen Arrhythmien auch schwerwiegende Störungen der Nierenfunktion verursachen. Die Niere ist für die Feineinstellung der Kaliumausscheidung verantwortlich und fungiert dadurch als zentrales Organ der Kaliumhomöostase. Eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Kaliumausscheidung durch die Niere spielen Kaliumkanäle, welche sich sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Membran von Nierenepithelien befinden. Eine möglichst umfassende Kenntnis der Funktion und Regulation dieser Kaliumkanalproteine ist Voraussetzung für ein verbessertes Verständnis der Mechanismen der Kaliumhomöostase und könnte damit zur Entwicklung neuer Strategien bei der Diagnostik und Therapie von Störungen des Kaliumhaushaltes beitragen. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der renalen Lokalisation der neu identifizierten Kaliumkanäle Kir4.1, THIK-1 und THIK-2.

Methodik: Es wurden immunhistochemische Markierungen, In situ Hybridisierung, Western Blot- und PCR-Analysen in Ratten- und Mausgewebe durchgeführt.

Ergebnisse: Kir4.1 wurde in der basolateralen Membran im medullären und kortikalen dicken aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife, im distalen Konvolut, im Verbindungstubulus und in den Hauptzellen des kortikalen Sammelrohrs in der Mausniere nachgewiesen. Die 2-Poren-Kaliumkanäle THIK-1 und THIK-2 zeigten, trotz ähnlicher molekularer Struktur, ein unterschiedliches Verteilungsmuster im Nephron sowie speziesabhängige Unterschiede in der subzellulären Lokalisation. THIK-1 wurde im gesamten Nephron und im Sammelrohr exprimiert. THIK-2 fand sich im distalen Nephron. Bei der Untersuchungen der subzellulären Verteilung für THIK-1 und THIK-2 zeigte sich in der Rattenniere ein intrazelluläres Signal. THIK-2 zeigte in der Mausniere eine bevorzugt basolaterale Lokalisation. Aufgrund der schwachen Immunreaktivität in der Mausniere wurde *in situ Hybridisierung* zur Lokalisation von THIK-1 ausgewählt und konnte damit keine Aussage über die intrazelluläre Verteilung gemacht werden.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine basolaterale Expression von Kir4.1 im distalen Nephron und in den Hauptzellen des Sammelrohres. Diese

Lokalisationsdaten wurden in späteren Studien durch andere Arbeitsgruppen weitgehend bestätigt und tragen entscheidend zum Verständnis der Pathophysiologie von humanen Erkrankungen wie dem SeSAME/EAST-Syndrom bei.

Die Ergebnisse zur Lokalisation der THIK Kanäle ergaben ein uneinheitliches Bild. Während die basolaterale Lokalisation von THIK-2 im distalen Nephron der Maus mit einer funktionellen Rolle bei der Ausbildung des *background K-leak* vereinbar ist, erscheint dies angesichts der intrazellulären Lokalisation von THIK-1 und THIK-2 in der Ratte als unwahrscheinlich. Weitere Studien sind daher notwendig, um die Bedeutung der beiden Kaliumkanäle für die Funktion der Niere aufzuklären.

Abstract (English)

Introduction: Alterations of potassium homeostasis are among the most frequent electrolyte disorders and may cause severe neurological symptoms, cardiac arrhythmias and renal dysfunction. The kidney is responsible for regulated potassium excretion and is thus essential for the maintenance of potassium balance. Potassium channels in the apical and in the basolateral membrane of renal epithelia play an essential role during transmembrane solute transport and are indispensable for regulated potassium secretion. Whereas the mechanisms of potassium transport in the apical membrane of renal epithelia have been extensively studied, little is known regarding the basolateral membrane compartment. A comprehensive knowledge of basolateral potassium channel proteins will improve our understanding of the mechanisms of potassium homeostasis and of renal function in general and may also facilitate the development of novel strategies for the diagnosis and treatment of disorders of potassium homeostasis. Aim of the present study was to characterize the cellular localization of Kir4.1, THIK-1 and THIK-2 in the kidney.

Material and methods: Immunohistochemistry, *in situ* hybridization, Western blot, and RT-PCR on microdissected nephron segments were used to study the renal expression of Kir4.1, THIK-1 and THIK-2 in rats and mice.

Results: Localization studies for Kir4.1 showed strong expression in the basolateral membrane of the thick ascending limb of the loop of Henle, the distal convoluted and the connecting tubule as well as in the cortical collecting duct of mice and rats. Despite a similar molecular structure the tandem pore domain potassium channels THIK-1 and THIK-2 showed different localization along the nephron and species-dependent differences in the subcellular localization between rat and mouse. Whereas THIK-1 was expressed throughout the nephron and the collecting duct, THIK-2 was exclusively localized to the distal nephron. Both, THIK-1 and THIK-2 showed intracellular localization in rat and murine kidney sections. By contrast, evaluation of THIK-2 signals in mice demonstrated expression in the basolateral membrane.

Conclusion: In the present study basolateral expression of Kir4.1 in the distal nephron and in the principal cells of the collecting tube was demonstrated. These localization data were largely confirmed in later studies by other groups and contributed to an understanding of the pathophysiology of human diseases including the SeSAME/EAST syndrome. The basolateral localization of THIK-2 in the distal nephron of the mouse kidney is compatible with a functional

role of the protein during basolateral potassium transport whereas the intracellular localization of THIK-1 and THIK-2 in the rat kidney argues against an involvement of the two channel proteins in this process. Further studies are therefore needed to characterize the role of the two potassium channels for renal function.

1 Einleitung

1.1 Kaliumfunktion und –regulation im Körper

Kalium ist das Hauptkation in den Zellen unseres Organismus. Die physiologische Regulation des Kalium-Gleichgewichts im Körper hängt von der Erhaltung der ungleichen Verteilung zwischen den extra- und intrazellulären Kompartimenten und von der effektiven renalen Exkretion ab. Nur etwa 2% des Gesamtkörperkaliums befinden sich im extrazellulären Raum. Die normale Kaliumkonzentration im Blutplasma schwankt zwischen 3,5 und 5 mmol/l, dagegen ist die intrazelluläre Kaliumkonzentration mit etwa 150 mmol/l 40fach höher. Dieser Konzentrationsgradient führt über in der Zellmembran gelegene K^+ -Kanäle zu einem Kaliumausstrom. Das so entstandene negative Membranpotential treibt nun die aus der Zelle diffundierenden K^+ -Ionen entlang des elektrischen Gradienten wieder zurück in die Zelle solange, bis die beiden entgegen gerichteten Triebkräfte gleich groß sind. Es herrscht ein Gleichgewichtspotential, das für K^+ -91 mV beträgt [1]. Das Membranpotential steuert eine Vielzahl von Zellfunktionen. Es dient der Nachrichtenübermittlung im Nervensystem, der Auslösung der Muskelkontraktion, dem transzellulären Transport in Epithelzellen sowie der Erhaltung des Zellvolumens. Die K^+ -Homöostase zwischen intra- und extrazellulärem Raum wird durch das Zusammenspiel von der Na^+ - K^+ -ATPase und den K^+ -Kanälen in der Zellmembran aufrechterhalten. Die Na^+ - K^+ -ATPase pumpt entgegen des Konzentrationsgradienten Na^+ aus, sowie K^+ in die Zelle. Die dabei benötigte Energie wird von der Zelle in Form von ATP zur Verfügung gestellt. Pro verbrauchtes ATP werden drei Na^+ -Ionen nach außen und zwei K^+ -Ionen nach innen transportiert, dadurch entsteht ein elektrisches Potential [1]. Letzteres dient anderen Transportprozessen zum Antrieb. Zur Vermeidung eines intrazellulären Kaliumkonzentrationsanstieges sowie einer extrazellulären Hypokaliämie muss Kalium aus der Zelle über Kaliumkanäle hinaus transportiert werden. Eine extrazelluläre K^+ -Konzentration von weniger als 3,5 mmol/l führt zu einer Abnahme der neuromuskulären Erregbarkeit und daraus resultierenden Komplikationen wie Adynamie, Paresen, Obstipation bis zum paralytischen Ileus und EKG-Veränderungen. Aber auch entgegengesetzte K^+ -Bewegungen zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum sind möglich. Diese können zu einer Hyperkaliämie führen. Ab einer K^+ -Konzentration von mehr als 5 mmol/l kommt es zu einer gesteigerten neuromuskulären Erregbarkeit, welche sich klinisch als Parästhesien, Muskelzuckungen oder lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen wie Kammerflattern/- flimmern oder Asystolie äußern kann.

Der K^+ -Haushalt im Körper wird renal bilanziert. 90% von dem mit der Nahrung aufgenommenem Kalium wird über die Niere wieder ausgeschieden. Die fraktionelle K^+ -Ausscheidung beträgt im Mittel 15%, doch variiert sie bei Kaliummangel bzw. bei starker Hyperkaliämie zwischen 1-3 und 150-200% [1]. Die renale K^+ -Exkretion ist das Resultat von drei Mechanismen: freie Filtration im Glomerulum, Resorption in den proximalen Nephronsegmenten, im TAL und kontrollierte Sekretion in den distalen Abschnitten [2]. Der proximale Tubulus und die Henle Schleife sind für rund 85-90% der Resorption des glomerulär filtrierten K^+ verantwortlich [1]. Die in diesen Segmenten ablaufende Resorption ist konstant und unabhängig von der bestehenden K^+ -Bilanz. Die Flexibilität der Kaliumausscheidung ist eine Leistung des distalen Nephrons und des Sammelrohrs. Kalium kann hier sowohl resorbiert als auch sezerniert werden. Diese Vorgänge werden vorwiegend hormonell über Aldosteron reguliert und somit an die Bedürfnisse des Organismus angepasst. Aldosteron ist ein Hormon aus der Gruppe der Mineralkortikoide und wird in der Nebenniere produziert. Es wird bei Hypovolämie oder Hyperkaliämie ausgeschüttet. Bei der Hypovolämie und der damit verbundenen Hypotonie kommt es unter der Wirkung von Aldosteron zur Natriumresorption im distalen Nephron ohne den Kaliumhaushalt zu verändern. Bei Hyperkaliämie wird Aldosteron-gesteuert die Kaliumsekretion im distalen Nephron gesteigert ohne die Natriumresorption zu beeinflussen. Diese getrennte Steuerung von zwei Ionen in zwei unterschiedlichen physiologischen Situationen wird Aldosteron- Paradox genannt [3].

1.2 Organisation und Funktion des Nephrons

Das Nephron ist die funktionelle Einheit der Niere. Es besteht aus dem Glomerulum und dem anschließenden Tubulus: proximalem Tubulus (PT), intermediärem Tubulus und distalem Tubulus. Im proximalen Tubulus werden histologisch zwei Anteile unterschieden: die Pars convoluta sowie die Pars recta. Der intermediäre Tubulus umfasst die dünnen Teile der ab- bzw. aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife (DTL/ATL). Der distale Tubulus setzt sich aus dem Pars recta (dicker aufsteigender Schenkel der Henle'schen Schleife; TAL), dem Pars convoluta (distales Konvolut, DCT) und dem Verbindungstubulus (CNT) zusammen. Das anschließende Sammelrohr (CD) ist embryologisch anderer Herkunft und gehört nicht zum Nephron. Es bildet aber mit dem Tubulussystem eine funktionelle Einheit. Im Sammelrohr werden das kortikale (CCD) und das medulläre Sammelrohr (MCD) unterschieden. Am Übergang vom proximalen zum distalen Tubulus nimmt das Nierenkanälchen noch einmal mit

dem Glomerulum Kontakt auf und bildet den juxtaglomerulären Apparat (JGA) der Niere. Dieser besteht aus der afferenten und der efferenten Arteriole, dem extraglomerulären Mesangium und der Macula densa (MD). Als Macula densa wird eine Subpopulation von TAL-Epithelzellen bezeichnet, die sich sowohl morphologisch als auch funktionell von den umliegenden TAL-Zellen unterscheidet [4].

Die Hauptfunktion des proximalen Tubulus ist die Rückresorption des größten Teils des im Glomerulum filtrierten Ultrafiltrates. Dazu gehören hauptsächlich Natrium und Wasser [1]. Charakteristisch für den proximalen Tubulus sind hohe Epithelzellen mit dichtem Bürstensaum an der luminalen Seite zur Vergrößerung der resorbierenden Zelloberfläche. Da die resorbierten Stoffe die basolaterale Membran passieren müssen, ist auch die basale Oberfläche durch Membraneinfaltungen stark vergrößert. Das für diesen Transport benötigte ATP wird in den Mitochondrien produziert, die zwischen den basolateralen Einfaltungen liegen und zusammen mit diesen das basale Labyrinth bilden. Spezifisches Markierungsprotein für diesen Nephronabschnitt ist Phalloidin, das die Aktinfilamente im Bürstensaum färbt.

Im anschließenden dünnen absteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife wird Wasser, aber kein Natrium zurückresorbiert. Die Wand des dünnen aufsteigenden Schenkels ist undurchlässig für Wasser. Es kommt zur passiven Resorption von Na^+ und Cl^- entlang des elektrochemischen Gradienten. Der intermediäre Tubulus fällt histomorphologisch durch ein besonders niedriges Epithel auf.

Im TAL wird ca. ein Drittel des filtrierten Na^+ durch den $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC2) an der luminalen Zellmembran resorbiert. Die Epithelzellen hier sind durch das Vorhandensein von Mikrovilli an ihrer apikalen Membran, sowie durch das basale Labyrinth, bestehend aus Membraneinfaltungen und dazwischen liegenden länglichen Mitochondrien, charakterisiert. Das Epithel von TAL ist wasserdicht. Durch die isolierte Salzresorption kommt es zur Verdünnung des Tubulusurins [5].

Von großer Bedeutung für die Koordination von glomerulärer Filtrationsrate (GFR) und Resorptionskapazität des Nephrons ist der JGA. Die Macula densa als Sensor für den Chloridgehalt des Tubulus liegt in direkter Nachbarschaft zum Gefäßpol des Glomerulums und bildet somit einen direkten Kontakt zwischen den glomerulären Gefäßen und dem aus dem Glomerulum hervorgehenden Tubulussystem. An dieser Stelle erreicht die Salzkonzentration der Tubulusflüssigkeit ihren niedrigsten Wert und unterliegt starken Schwankungen. Ähnlich wie die TAL-Zellen besitzt die apikale Zellmembran der Macula densa eine hohe Dichte des NKCC2-Transporters [6]. Zur Identifikation der Macula densa wurde in dieser Arbeit eine

Markierung mit Tamm-Horsfall-Protein (THP) benutzt, das ausschließlich im TAL lokalisiert ist und keine Immunreaktivität in der Macula densa zeigt [7].

An die Henle'sche Schleife schließt sich das distale Konvolut an, welches über das Verbindungsstück in das Sammelrohr mündet. In diesen letzten drei Abschnitten (DCT, CNT und CD) erfolgt die Feineinstellung der Na⁺- und Wasserresorption unter dem Einfluss von Hormonen (ADH, Aldosteron) und anderen Signalen. Mit Hilfe des Thiazid-sensitiven Na⁺-Cl⁻-Kotransporters (NCC) in der apikalen Membran werden im DCT, vom Aldosteron abhängig, weitere 5-10% des filtrierten Na⁺ zurückresorbiert [8]. Das Epithel des distalen Konvoluts erscheint durch die mehrfach gestaffelten Schlussleisten relativ dicht, ist aber deutlich niedriger als im proximalen Tubulus [1].

Im Verbindungstubulus und Sammelrohr erscheinen zum ersten Mal, zwischen den Hauptzellen unregelmäßig verteilt, die Schalt- oder Zwischenzellen, die für die Feineinstellung des Säure-Basenhaushaltes zuständig sind. Ferner werden im späten DCT, CNT und CD die Na⁺-Resorption sowie die K⁺-Ausscheidung durch die Zusammenarbeit des Amilorid-sensitiven epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC) und des luminalen K⁺-Kanals (ROMK) reguliert. Die CNT-Zellen exprimieren Calbindin, ein zytosolisches Ca²⁺-bindendes Protein. Seine Lokalisation beginnt in der zweiten Hälfte des DCT, dehnt sich auf den CNT aus und geht in das kortikale Sammelrohr über. Immunhistochemisch zeigt sich die stärkste Intensität im CNT. Schaltzellen sind dabei generell negativ. Eine weitere wichtige Funktion des Sammelrohres ist die Feineinstellung der Wasserresorption, unabhängig von der Na⁺-Resorption. Hier können unter ADH-Kontrolle 10 bis 15% Wasser, vermittelt durch das luminale Aquaporin 2 (AQP2) und das basolaterale Aquaporin 3 bzw. 4 (AQP3 bzw. AQP4), rückresorbiert werden. Dieser Vorgang wird von dem im Rahmen des renalen Konzentrierungsmechanismus geschaffenen osmotischen Gradienten angetrieben [9].

1.3 *Inward rectifier* K⁺-Kanäle und Kir4.1

Kaliumkanäle sind transmembrane Proteine, die hoch selektiv den passiven K⁺-Transport durch die Zellmembran ermöglichen. Die Kaliumkanäle der Niere werden in vier Hauptgruppen unterteilt: spannungsabhängige K⁺-Kanäle (K_v), kalziumaktivierte K⁺-Kanäle (K_{Ca}), *inward rectifier* K⁺-Kanäle (Kir) und 2-Poren-K⁺-Kanäle (K_{2P}) [2].

Zu der Familie der *inward rectifier* Kaliumkanäle gehören sieben Mitglieder, die als Kir1 bis Kir7 bezeichnet werden. Sie bestehen aus zwei transmembranen Segmenten und einer zentralen

Pore. Ihre Leitfähigkeit ändert sich mit dem Potential der Zellmembran. Allgemein ist der K^+ -Einstrom durch die Kir-Kanäle in die Zelle größer als der Ausstrom (Potential).

Einer der bestuntersuchten Kanäle aus der Gruppe ist Kir1.1 (ROMK1). ROMK1 wird in der apikalen Zellmembran des TAL exprimiert und dient der Rezirkulation von K^+ -Ionen für den NKCC2. Im Sammelrohr nimmt ROMK1 an der Feinregulation der Kaliumsekretion teil [10]. Er ist pH und Mg^{2+} -ATP sensitiv.

Die Aminosäuresequenz von dem in dieser Arbeit untersuchten Kaliumkanal Kir4.1, entspricht zu 53% der Sequenz von ROMK1. Der Kir4.1-Kanal wird vom KCNJ10-Gen kodiert und gehört zu den ATP-sensitiven K^+ -Kanälen (K_{ATP}). Sie zeigen eine Abweichung von der klassischen Funktion der *inward rectifier*. Bei den K_{ATP} ist der K^+ -Einstrom sehr gering und es kommt zu einem netto K^+ -Ausstrom [11]. Der Kir4.1-Kanal wurde zum ersten Mal im zentralen Nervensystem (ZNS) entdeckt [12]. Es wird in den Astrozyten in der Nähe von Synapsen und Blutgefäßen sowie in Oligodendrozyten exprimiert [13]. Im ZNS ist der Kaliumkanal in der so genannten „räumlichen Kaliumpufferung“ (K^+ *spatial buffering*) involviert [14, 15]. In späteren Studien wurde die Lokalisation von Kir4.1 auch in den Müllerzellen der Retina, im Innenohr sowie in der Niere beschrieben. Kir4.1 wurde ebenfalls in der Basolateralmembran von DCT, CNT und dem beginnenden CCD der Rattenniere beschrieben [16]. Spätere *patch clamp* Untersuchungen zeigten aber die Anwesenheit eines *inward rectifier* Kanals auch auf der basolateralen Seite der TAL-Zellen, deren physiologische Eigenschaften (Ionenleitfähigkeit von 35 ± 1.3 Ps) eine Ähnlichkeit mit Kir4.1 aufwies [17]. Zu diesem Kanal gab es noch kein immunhistochemischen Korrelat.

1.4 2-Poren- K^+ -Kanäle und THIK-1 und THIK-2

Die Familie der K_{2P} ist mit über 50 Mitgliedern die größte unter den Kaliumkanälen. Sie bestehen aus vier transmembranen Segmenten und 2 Poren. Als Hauptfunktion der K_{2P} -Kanäle wird das *background K^+ Leak* angenommen. Der schwache Hintergrund-Kaliumfluss sollte das Ruhepotential der Zellmembran stabilisieren. Der „ideale“ *background- K^+ -Fluss* sollte unabhängig von dem Membranpotential sein. Das bedeutet, dass der Öffnungszustand dieser Kaliumkanäle zu jedem Membranpotential gleich sein sollte, nur die Amplitude des Ionenstroms sollte sich entsprechend des Membranpotentials verändern. Sie sollten keine aktiven und inaktiven Zustände haben und damit zeitunabhängig sein [18].

K_{2P}-Kanäle sind abhängig vom zytoplasmatischen und extrazellulären pH-Wert, von der Temperatur, vom Zellvolumen und von mechanischen Kräften. Bis jetzt wurden 15 K_{2P}-Kanäle kloniert, acht davon werden auch in der Niere exprimiert [19,20,21,22,23].

In dieser Studie wird die Lokalisation in den einzelnen Nephronsegmenten von zwei weiteren 2P-Kaliumkanälen- THIK-1 (K_{2P}13.1, KCNK13) und THIK-2 (K_{2P}12.1, KCNK12) (*tandem pore domain halothane inhibited K⁺ channels*) untersucht. Sie wurden primär aus dem Rattenhirn isoliert und kloniert. Trotz eines identischen strukturellen Aufbaus zeigten sie nur in 25%-35% eine funktionelle Ähnlichkeit zu den anderen 2-Poren-Kaliumkanälen, sind aber zu 65% identisch zu einander [24]. THIK-1 wird von Arachidonsäure aktiviert und von Halothan inhibiert. THIK-2 wird auch von Halothan inhibiert, ist aber im Gegenteil zu THIK-1 unempfindlich gegen Arachidonsäure [25].

Die Expression von THIK-1 und THIK-2 in der Niere wurde in PCR-Analysen beschrieben [24]. Eine genauere Untersuchung der Lokalisation in den Nephronabschnitten und der Verteilung in den Epithelzellen wurde bis jetzt nicht durchgeführt.

1.5 Zielsetzung

Die Kaliumkanäle an der basolateralen Membran der Epithelzellen spielen eine wichtige Rolle in der Funktion der Niere. Sie regulieren die Rezirkulation von Kalium in Abhängigkeit von der Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase an der basolateralen Membran. Sie sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung des negativen Potentials der Zellmembran und des Zellvolumens und unterstützen die Resorption von Na⁺, Cl⁻, Mg²⁺, Ca²⁺, Glukose. Viele von diesen Kaliumkanälen sind noch unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es die Lokalisation von drei neuen Kaliumkanälen in der Niere zu untersuchen. Mit Hilfe von unterschiedlichen Methoden wie immunhistochemischen Färbungen, In situ Hybridisierung, Western-Blot und PCR wird die Verteilung von Kir4.1, THIK-1 und THIK-2 in den einzelnen Nephronabschnitten beschrieben, die Unterschiede zwischen einzelnen Nagetieren untersucht und die intrazelluläre Lokalisation in den Epithelzellen gezeigt.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Perfusionsfixierung

Männliche Sprague-Dawley Ratten (180-200g) und männliche C57/ Black 6 Mäuse (25-30g) wurden von der lokalen Tierabteilung bezogen und unter freiem Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser gehalten. Die Tiere wurden mit Äther narkotisiert und gewogen. Anschließend wurden sie durch intraperitoneale Injektion einer Kombination aus Ketamin (Narketan 10, Chassot AG, Belp, Schweiz; 80 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (Rompun, Bayer, Leverkusen; 33 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Nach Eröffnung des Abdomens durch eine mediane Laparotomie erfolgte die vorsichtige Freilegung der Aorta abdominalis. Nach der Punktion, distal der Abgänge der Aa. renales, wurde die Aorta über einen ausgezogenen PE-Schlauch mit dem Perfusionssystem verbunden. Zum Druckausgleich wurde die Vena cava inferior eröffnet. Die Nieren wurden retrograd perfundiert. Zunächst wurde bei einem konstanten Perfusionsdruck von 200 mmHg mit einem Waschpuffer (6 Teile 0,1M Cacodylatpuffer [pH 7,5], 4 Teile Hydroxyethylstärke in physiologischer Kochsalzlösung [HAES steril, Fresenius AG, Bad Homburg] mit Sucrose auf 300mOsm eingestellt) für 45s vorgespült. Nach der anschließenden Fixierung mit einer Lösung aus 3% Paraformaldehyd in PBS für 5min erfolgte die Entnahme der Nieren.

2.2 Zellkultur

Die OK-Zellen (Proximale Tubuluszellen) wurden in 35 mm Zellkulturschalen auf Glasboden in DMEM-Medium mit 10 % fetalem Kalbserum, 100 IE Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und einer Atmosphäre aus 5 % CO₂ und 95 % Raumluft kultiviert.

2.3 Gewebeprozessierung

2.3.1 Gewebeprozessierung für Immunhistochemie und In situ Hybridisierung

Die Nieren wurden nach der Entnahme für Gefrierschnitte zum Schutz vor Gefrierartefakten in einer PBS-Sucrose-Immersionlösung (800mOsm/kg H₂O [pH 7,4]) bei 4°C über Nacht aufbewahrt und anschließend in stickstoffgekühltem Isopentan schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für Paraffinschnitte wurden die Nieren in einer Lösung aus

3% Paraformaldehyd in PBS für weitere 12h nachfixiert, in einer Ethanolreihe aufsteigender Konzentrationen (je 15 Min. in 50%, 70%, 90%, 96% Ethanol und 3x 20 Min. 100% Ethanol) entwässert und in Paraffin eingebettet.

2.3.2 Gewebeprozessierung für Immunblotting

Nach der Entnahme der Nieren wurde der Cortex vom Nierenmark mit Hilfe einer scharfen Rasierklinge getrennt. Das Nierenkortexgewebe und OK-Zellen wurden 3 min mit einem Gewebehomogenisator (Diaz 600, Heidolph Instruments) in eisgekühltem Homogenisierungspuffer (250 mM Sucrose, 10 mM Triethanolamine, 1 Tablette/50 ml Proteaseinhibitor) aufbereitet. Das Gewebehomogenat wurde bei 1.000 g 10 min lang zentrifugiert (Sigma 3K15 kühlende Zentrifuge), um die Zellnuclei und unvollständig homogenisierte Membranfragmente zu entfernen. Der Überstand wurde bei 200.000 g und 4°C 1h zentrifugiert (Beckman LE 80 Ultrazentrifuge). Das Pellet, welches Plasmamembranen und intrazelluläre Vesikeln enthält, wurde in Homogenisierungspuffer aufgelöst. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen des Homogenates erfolgte indirekt kolorimetrisch mit einem Kit (Micro BCA.TM Protein Assay Reagent Kit, Pierce, Rockford, USA).

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Primär- und Sekundärantikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende primäre und sekundäre Antikörper verwendet:

Antikörper	Wirt	Hersteller
Anti-Kir4.1	Kaninchen	Dr. Derst
Ant-THIK-1	Kaninchen	Dr. Derst
Anti-THIK-2	Kaninchen	Dr. Desrt
Anti-THP	Kaninchen	Dr. Hoyer
Anti-NKCC2	Meerschweinchen	Dr. Ellison
Anti-NCC	Kaninchen	Dr. Ellison
Anti-NCC	Meerschweinchen	Dr. Ellison
Anti-Calbindin	Maus	SigmaAldrich

Anti-AQP2	Ziege	Santa Cruz Biot.
Cy-3 anti-Kaninchen	Ziege	Dako
Cy-2 anti-Meerschweinchen	Ziege	Dako
Cy-2 anti-Schaf	Esel	Dako
Cy-2 anti-Maus	Esel	Dako

2.4.2 Antikörperinkubation und Antikörperdetektion

2.4.2.1 Immunfluoreszenz

Die immunohistochemischen Färbungen wurden an 5µm dicken Gefrierschnitten und OK-Zellen durchgeführt. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte mit einem Blocking-Medium (5% Magermilchpulver in PBS) für 1h bei Raumtemperatur in einer feuchten Inkubationskammer inkubiert. Dann erfolgte die Inkubation für 1h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit den unter 2.4.1 angegebenen Primärantikörpern. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach sorgfältigen Waschschritten (3x10 min in PBS) mit den passenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern beschichtet und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Doppelmarkierungen wurden die Gewebeschnitte konsekutiv mit den entsprechenden Sekundärantikörpern gefärbt. Es wurden, bei aus dem gleichen Wirt stammenden Primärantikörpern, Folgeschnitte benutzt. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI markiert. Die Schnitte wurden mit PBS/Glycerin (pH 8,6) bedeckt und fluoreszenzmikroskopisch (Leica DMRB mit Auflicht-Fluoreszenzmodell) analysiert und fotografiert.

2.4.2.2 Preembedding

Für die Preembedding-Färbung wurden 30 µm Vibratom-Schnitte benutzt. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden zuerst mit 20% NGS für 1h bei Raumtemperatur blockiert. Die Schnitte wurden anschließend mit dem Primärantikörper für 48 h bei 4°C inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen mit TBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte mit 0,1% DAB (Sigma, Traufkirchen) und 0,02% H₂O₂ inkubiert. Die Peroxidase oxidiert das Diaminobenzidin mit

H₂O₂ zu einem stabilen braunen Farbstoff. Die Entwicklung des Signals wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und mit TBS abgestoppt. Die gefärbten Schnitte wurden nach Entwässerung in einer Ethanolreihe aufsteigender Konzentrationen (je 10 min in 50%, 70%, 70% [über Nacht], 90%, 96% und 100% Ethanol) in Epon 812 eingebettet, semidünn geschnitten und unter dem Lichtmikroskop (Leica) analysiert und fotografiert.

2.5 Western Blot

Die Separation der Proteine erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese in einem 10%igen Polyacrylamidgel. Es wurden 2 µg Proteinhomogenat in 6 µl Probenpuffer (2% SDS, 10% Glycerin, 5% beta-Mercaptoethanol, 1% Bromphenolblau und 95 mM Tris [pH 6,8]) aufgenommen, mit Tris/EDTA auf ein Gesamtvolumen von 15 µl aufgefüllt und für 3 min bei 95°C denaturiert. 10%ige Polyacrylamidgele wurden mit einem Sammelgel überschichtet und in eine mit Laufpuffer (0,192 M Glycin, 0,1% SDS, 0,025 M Tris [pH 8,3]) gefüllte Anodenkammer (Boehringer Ingelheim) gehängt. Pro Geltasche wurden je 15 µl Probevolumen aufgetragen. Eine Tasche pro Gel wurde mit dem Rainbow-Molekulargewichtsmarker (BioRad) beladen. Die angelegte Anodenspannung betrug 140V. Die Laufzeit der Gele betrug ca. 120 min. Danach wurden die Gele für 2 min in Transferpuffer (0,192 M Glycin, 20% Methanol, 0,025 M Tris [pH 8,3]) equilibriert. Anschließend wurden die Proteine aus Minigelen in einer semi-dry Blottkammer (Biometra) bei 250 mA für 45min auf Nitrozellulosemembranen (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert. Die Ausbeute des Elektrotransfers wurde mit einer Ponceau S Färbung der Proteinbanden auf den Membranen beurteilt. Durch die nachfolgenden Waschschrte wurde der Farbstoff wieder entfernt. Die spezifischen Primärantikörper, die beim Western Blot bzw. der Immunhistochemie zur Anwendung kamen, sind unter 2.4.1 aufgelistet. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranen für 30min in 5%iger Magermilchlösung/PBS geblockt. Die Inkubation der Membranen mit dem entsprechenden Primärantikörper erfolgte in 5%iger Magermilchlösung für 2 h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C. Die Membranen wurden dreimal in Tween PBS (0,1% Tween, [pH 7,5]) gewaschen. Danach erfolgte Inkubation mit dem HRP-konjugierten anti-Kaninchen-IgG Sekundärantikörper (1:2000 in PBS) für 2 h bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden erneut mit PBS gewaschen und für 1 min mit *enhanced chemiluminescence substrate reagent* (ECL, Amersham, Freiburg) inkubiert. Das Luminol wird im alkalischen Milieu durch die an den Sekundärantikörpern gebundene Peroxidase mit H₂O₂ oxidiert. Dadurch fällt das Luminol unter

Lichtemission auf einen energetisch niedrigeren Zustand zurück. Mit den inkubierten Membranen wurde ein Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL) in einer Dunkelkammer für 5 bis 15 min belichtet und entwickelt. Zur Quantifizierung des Proteingehalts in den Proben wurde der Film anschließend eingescannt.

2.6 PCR

OK-Zellen wurden homogenisiert. Das Gesamt RNA wurde getrennt mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) isoliert. Die cDNA wurde aus 5 µg gesamt OK-RNA mit Hilfe des *cDNA synthesis kit* (Invitrogen) gewonnen. Die Auswahl der Primer erfolgte mit Hilfe des von der GenBank (NCBI, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellten Computerprogramms BLAST. Die Primer wurden von der Firma TIB MOBIOL, Berlin, synthetisiert. Für den humanen THIK-1 (5'-TCA TCG TGC TCT ACC TGC TG-3'; 5'-TCC TAC TGT CGC CGG AGT-3') wurde ein cDNA-Fragment von 290 bp und für den humanen THIK-2 (5'-GCT CAT CGG CCT CTA CCT G-3'; 5'-GAG GTT GAA GAA CAG GAT GGT C-3') von 358 bp amplifiziert.

Die PCR wurde mit der hitzestabilen Taq Polymerase (GIBCO, Eggenstein) mit 23 bis 35 Zyklen in einem Thermocycler (Perkin Elmer, FRG) durchgeführt. Der PCR Ansatz enthielt 3µl Template, 5µl PCR Puffer, 1,5µl MgCl₂ (50mM), 1µl dNTP Mix (10mM), 2x je 1 µl Primer (20pM), 0,5µl Taq Polymerase (5U/µl) und 37µl aq. Dest. Jeder Zyklus bestand aus Denaturierung bei 94°C, Annealing bei 59-66°C und Amplifikation bei 72°C für je 1min.

Die Expression von THIK wurde auch in OK Zellen mittels RT-PCR verifiziert. Die RNA wurde aus den OK-Zellen mit RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Für die opossum-THIK-1 wurden folgende Primerpaare verwendet: 5'-GAG CCT GGA TGA GAT TCG AG-3'; 5'-TAC ACA GAG GGC TTC CAT CC-3') und für opossum-THIK-2: 5'-GCT GCT CTC TTT CCT TCG AG-3' and 5'- ATG CCC AGG ATA AGC ATC AC -3'.

Die PCR Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.7 In situ Hybridisierung mit nicht-radioaktivem Detektionssystem

2.7.1 Präparation der cDNS

Zur Herstellung der Riboproben wurde aus einem Mausnieren-RNS-Extrakt mittels RT-PCR ein ~700 bp langes THIK-1 und ein ~650 bp langes THIK-2 cDNS-Fragment generiert. Die hierzu nötigen Primer waren so gewählt, dass die synthetisierte Sequenz die Positionen 994-1701 der mRNA für THIK-1 (Accession number AF287301) und die Positionen 1212-1866 für THIK-2 (Acc. No. AF287300) umfasste. Die Identität der generierten Probe wurde durch maschinelle Sequenzierung (Perkin-Elmer) abgesichert. Die cDNA wurde in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pBluescript KS+ (Stratagene, La Jolla, USA), der zuvor mit SmaI (Boehringer, Mannheim) geschnitten worden war, inkloniert. Diese Klonierungsstelle wird jeweils von einer Promotorstelle für die *Transkriptionspolymerasen T3 und T7* flankiert.

2.7.2 In vitro-Transkription zur Herstellung Digoxigenin-markierter Riboproben

Die in vitro-Transkription zur Herstellung markierter RNS-Proben wurde mit Hilfe einer SP6 und T7 Polymerase (Boehringer, Mannheim) unter Verwendung von Digoxigenin-markiertem Substrat durchgeführt. Bei der Herstellung jeder Probe wurden in verschiedenen Ansätzen beide Polymerasen verwendet, so dass durch die komplementäre Leserichtung der Enzyme jeweils eine Antisense- und eine Sense-RNS-Probe entstanden. Die Antisense-Probe, die das komplementäre Gegenstück zur zellulären mRNA bildet, diente als Nachweis für die RNS-Expression, während die Sense-Probe als Kontrollsonde benutzt wurde. Für die Transkription wurde jeweils 1 µg des linearisierten Plasmids als Matrize eingesetzt und zusammen mit 13 µl Diethyl-Pyrocbonat (DEPC, Sigma, St. Louis, USA) behandeltem H₂O, 2 µl Transkriptionspuffer (Boehringer, Mannheim), 2 µl Nukleotidgemisch mit Digoxigenin-markiertem Uridin 5'-Triphosphat (DIG-Labeling Mix; Boehringer, Mannheim) und 2 µl der jeweiligen RNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) für 2,25 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte der enzymatische Verdau der DNA-Matrize durch eine 15-minütige Inkubation mit RNase freier DNase (Boehringer, Mannheim). Die RNA wurde mit Lithium-Chlorid und 100% Ethanol gefällt, mit 80% Ethanol gewaschen und nach anschließender Trocknung in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Um die RNA zu quantifizieren und die Güte des Transkriptionsproduktes zu beurteilen, wurden photometrische Bestimmungen und Agarosegel-Elektrophoresen durchgeführt.

2.7.3 Hybridisierung Digoxigenin-markierter Riboproben

Für die In situ Hybridisierung wurden Paraffinschnitte von 6 µm Dicke verwendet. Sie wurden mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Paraffinschnitte wurden für 15 min in eisgekühltem 4% Paraformaldehyd (in PBS, pH 7,4) nachfixiert. Nach Waschschrinen in PBS und einem Deproteinierungsschritt mit Proteinase K in PBS für 30 min wurden die Schnitte für 20 min in 0,1 M HCl inkubiert. Es folgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 5 Min. in 70%, 80% und 96% Ethanol). Nachdem die Schnitte für 20 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet waren, wurden sie mit einem Prähybridmix (50% deionisiertes Formamid [Merck, Darmstadt], 40 mM Tris-HCl [Trometamol, Merck, Darmstadt/HCl; pH 7,4], 25 mM EDTA [Roth, Karlsruhe], 20 mM NaCl, 0,25 mg/ml tRNA, 2,5x Denhardt-Lösung [100 x = 0,05% Ficoll, 0,05% Polyvinylpyrrolidon und 0,05% bovines Serumalbumin], alle Produkte - soweit nicht anders angegeben – von Boehringer, Mannheim) bedeckt und für 2 h bei 40°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Entfernen des Prähybridmixes wurden die Schnitte mit dem Hybridmix (50% deionisiertes Formamid, 200 mM Tris-HCl [pH 7,4], 1 mM EDTA [pH 8], 0,2 M Dithiothreitol [Biomol, Hamburg], 0,33 M NaCl, 5 mg/ml tRNA, 1 mg/ml Heringsperma [beides Boehringer, Mannheim], 10x Denhardt-Lösung, 10% Dextransulfat [Sigma, St. Louis, USA], mit 2-8 pg Digoxigeninmarkierter Riboprobe [die optimale Sondenkonzentration wurde für jede Riboprobe austitriert]) überschichtet. Um eine Austrocknung der Schnitte zu verhindern, wurden sie mit silikonisierten (Sigmacote, Sigma, St. Louis, USA) Deckgläschen bedeckt und für 18-20 h bei 40°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

2.7.4 Waschschrine zur Entfernung nicht hybridisierter Riboproben

Die silikonisierten Deckgläschen wurden in einer Natriumzitratlösung (2x Standard Sodium Citrat, SSC = 18% NaCl/15% Na-Citrat [beides Merck, Darmstadt]) abgelöst und die Schnitte für 30 min in derselben Lösung bei 40°C gewaschen. Es folgten weitere Waschschrine in verschiedenen Waschlösungen bei unterschiedlichen Temperaturen (30 min in 0,38x SSC/50% deionisiertem Formamid und 1 h in 0,1x SSC/50 % deionisiertes Formamid, beide Waschschrine bei 40°C; 2x 10 min in 0,5x SSC und 10 min in 0,2x SSC bei Raumtemperatur).

2.7.5 Detektion der hybridisierten Riboproben

Zur Detektion der hybridisierten Riboproben wurden die Schnitte nach einer 30 min Inkubation mit Blocking-Medium (1% Boehringer Blockierungsreagenz, 0,5% Rinderserumalbumin in 100 mM Tris-HCl [pH 7,5]/150 mM NaCl gelöst), mit einem alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper (Boehringer, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:500 in Blocking-Medium beschichtet. Nach einer 1-2 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttelgerät wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C gelagert. Die enzymatische Farbentwicklung der Schnitte wurde unter Verwendung eines Entwicklungspuffers nach Boehringer (Nitroblau Tetrazolium und 5Bromo-4Chloro-3Indolyl-Phosphat als Enzymsubstrate, sowie Levamisol [Sigma, St. Louis, USA] zur Hemmung endogener Phosphatasen; pH 9,5) unter Lichtabschluss bei 4°C durchgeführt und in Abhängigkeit von der angestrebten Intensität der Nachweisreaktion nach 4-48 h abgestoppt. Nachdem die Schnitte zweimal 15 min in Tris-puffer (100 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) gewaschen worden waren, folgten zwei weitere Waschschrte für jeweils 15 min in PBS. Abschließend wurden die Schnitte mit 50% Glycerin (Merck, Darmstadt)/PBS eingedeckt und mit einem Leica DMRB Mikroskop mit Interferenzkontrastlicht ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Lokalisation von Kir 4.1 in der Mausniere

Der Kaliumkanal Kir4.1 wurde mit Hilfe von morphologischen Kriterien und segmentspezifischen Markierungen in der Niere lokalisiert. Färbungen mit dem Kaninchen anti-Maus-Kir4.1-Antikörper zeigten eine Expression ausschließlich in der basolateralen Membran der Nephronepithelien. Dabei war die Expressionsstärke entlang des Nephrons unterschiedlich ausgeprägt. Der K^+ -Kanal Kir4.1 ist in der äußeren Medulla sowie im Cortex der Mausniere vorzufinden.

Eine Kir4.1-Immunreaktivität wurde in der basolateralen Membran des TAL, die durch die Invaginationen relativ breit erscheint, vorgefunden. Die Intensität der Kir4.1-Expression war im TAL-Segment schwächer ausgeprägt als in nachfolgenden Nephronabschnitten. Mit dem Übergang zum distalen Konvolut stieg die Expressionsstärke deutlich an. Zur Identifizierung des TAL wurde eine Doppelmarkierung mit NKCC2 gewählt (Abb. 1). Kir4.1 zeigte einen gleichzeitigen Beginn der Immunreaktivität im medullären TAL wie NKCC2 und eine Koexpression im kortikalen Teil des TAL.

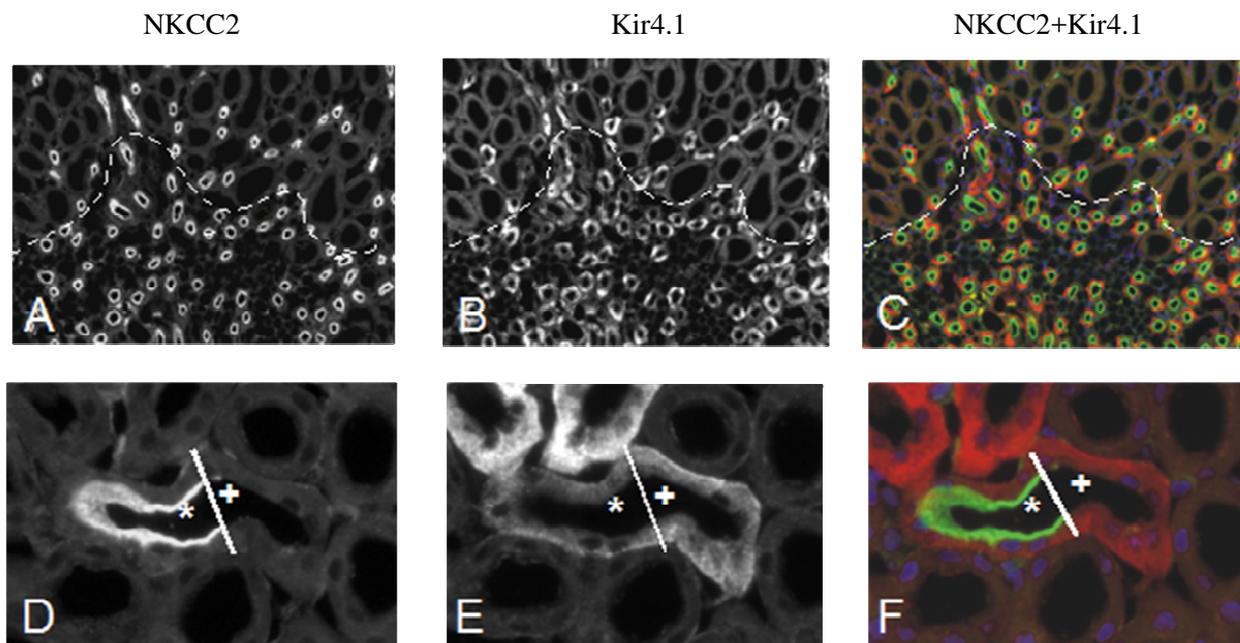


Abbildung 1: Verteilung von Kir4.1 Immunreaktivität in Cryostatschnitten von Nierengewebe der Maus.

(A-F) Zur Segmentidentifizierung ist eine Doppelmarkierung mit NKCC2 für den TAL unter Benutzung verschiedener Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper gezeigt. NKCC2- (A) und Kir4.1-Verteilung (B) in der Medulla. Die gestrichelte Linie zeigt den Übergang vom Innenstreifen zum Außenstreifen des äußeren Markes an. (C) Bildüberlagerung. Kir4.1 ist hier basolateral lokalisiert. (D) NKCC2 zeigt den Übergang vom cTAL (Stern) in

den DCT (Plus). (E) Kir4.1 zeigt ein schwaches basolaterales Signal im cTAL und eine Steigerung der Expression mit Beginn des DCT. (F) Die Bildüberlagerung verdeutlicht die Lokalisation. NKCC2 in grün und Kir4.1 in rot. Vergrößerung (A-C) ca. x100, (D-E) ca. x300.

In der Macula densa zeigte Kir4.1, genauso wie THP keine Immunreaktivität (siehe Abbildung 2).

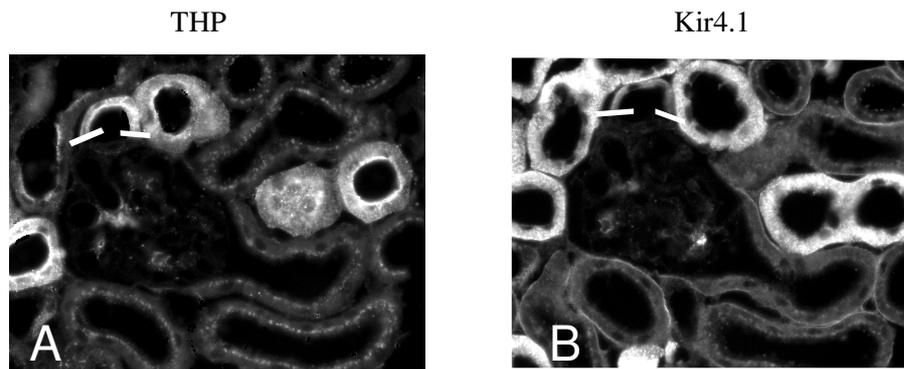


Abbildung 2: Doppelmarkierung von THP (A) und Kir4.1 (B) im cTAL unter Benutzung von Folgeschnitten. Die Macula densa ist über die Abwesenheit von THP definiert, der Nephronsegmentabschnitt zwischen den beiden Balken. Kir4.1 zeigt hier auch keine Expression. Vergrößerung ca. x300.

In dem anschließenden DCT zeigte Kir4.1 eine starke basolaterale Expression. Der Expressionsanstieg des Kir4.1 am Übergang zum DCT konnte durch die Doppelmarkierung mit anti-NCC bestätigt werden (siehe Abbildung 3). Mit dem Übergang zum CNT, gekennzeichnet durch die abrupte Abwesenheit des NCC, fand sich für die Expression des Kir 4.1 kein Intensitätsunterschied.

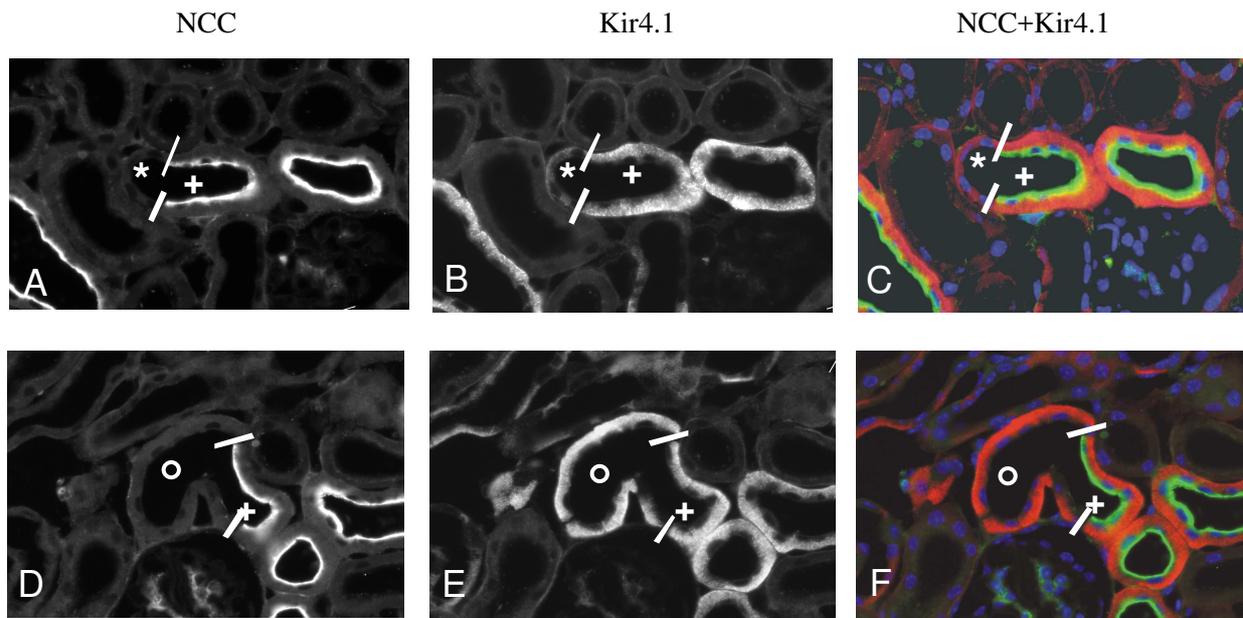


Abbildung 3: Verteilung von Kir4.1 Immunreaktivität im distalen Konvolut des Nierenkortexes.

(A-F) Zur Segmentidentifizierung ist eine Doppelmarkierung mit NCC für den DCT unter Benutzung verschiedener Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper gezeigt. (A) NCC zeigt den Übergang vom cTAL (Stern) in den DCT (Plus). (B) Kir4.1 besitzt einen Anstieg der Expressionsstärke am Segmentübergang. (C) Bildüberlagerung, NCC in grün und Kir4.1. in rot. (D) Der Abschluss der NCC Expression markiert den Übergang vom DCT (Plus) in den CNT (Kreis). (E) Kir4.1 zeigt eine gleichbleibende Expressionsstärke. (F) Bildüberlagerung, NCC in grün und Kir4.1 in rot. Vergrößerung ca. x300

In Abbildung 4 ist die Doppelmarkierung von Calbindin und Kir4.1 im Verbindungstubulus dargestellt. Kir 4.1 konnte auch in diesem Segment in der basolateralen Membran lokalisiert werden. Die Schaltzellen waren für beide Markierungen immunhistochemisch negativ. Wie bereits in der Doppelmarkierung mit anti-NCC dargestellt, konnte kein Intensitätsunterschied für die Markierung von Kir 4.1 am Übergang vom DCT zum CNT festgestellt werden. Am Übergang zum Sammelrohr, gekennzeichnet durch den Expressionsabfall von Calbindin, sank auch die Immunreaktivität von Kir 4.1 (siehe Abbildung 4).

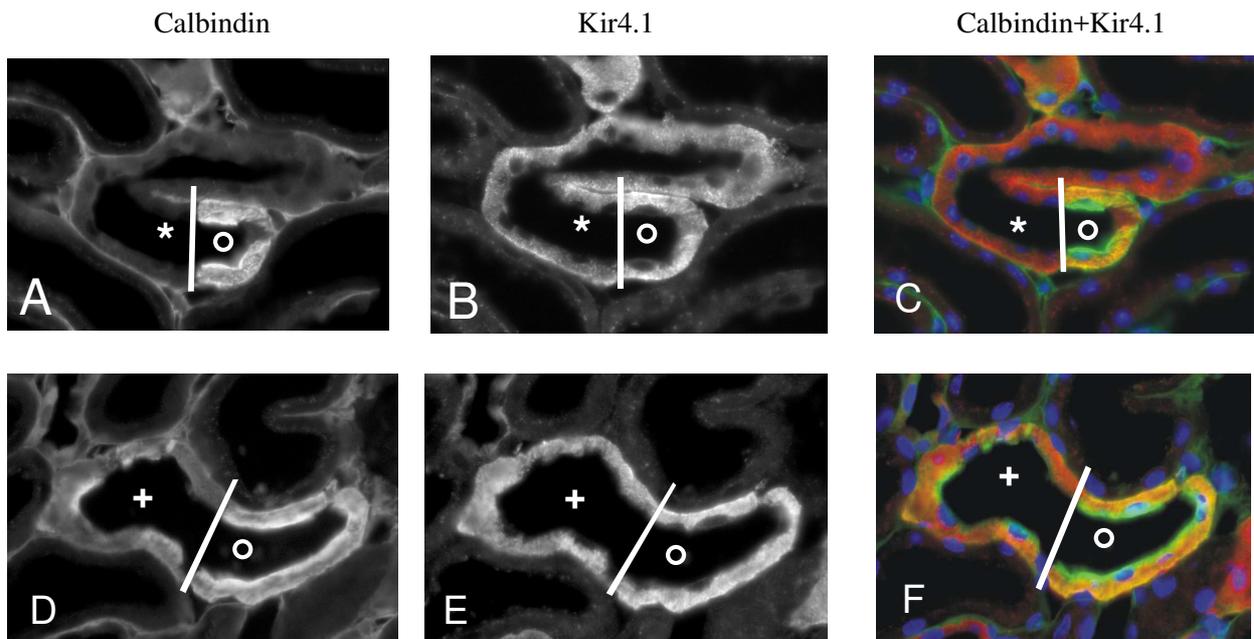


Abbildung 4: Verteilung von Kir4.1 Immunreaktivität im distalen Konvolut des Nierenkortexes.

(A-F) Zur Segmentidentifizierung ist eine Doppelmarkierung mit Calbindin für die 2. Hälfte des DCT und des CNT unter Benutzung verschiedener Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper gezeigt. (A) Calbindin unterscheidet die erste Hälfte des DCT (Stern) von der zweiten Hälfte (Kreis). (B) Kir4.1 ist jeweils gleich stark basolateral exprimiert. (C) Bildüberlagerung, Calbindin in grün und Kir4.1 in rot. (D) In der Maus ist Calbindin im CNT stark und im CCD schwach exprimiert. Calbindin zeigt so den Übergang vom CNT (Kreis) zum CCD (Plus). (E) Kir4.1 wird ebenfalls im CCD schwächer exprimiert. (F) Bildüberlagerung, NCC in grün und Kir4.1 in rot. Vergrößerung ca. x300.

Abbildung 5 zeigt die Verteilungsmuster von Kir4.1 und AQP2. Beide sind ausschließlich in den Hauptzellen des Sammelrohres lokalisiert, dabei zeigte sich für Kir4.1 eine Expression in der basolateralen Membran, welche im Vergleich zur Expression im CNT schwächer war. Die Kir4.1-Markierung erstreckt sich im Verlauf bis zum medullären Sammelrohr und erlischt hier an der Grenze zwischen Außen- und Innenstreifen des äußeren Markes.

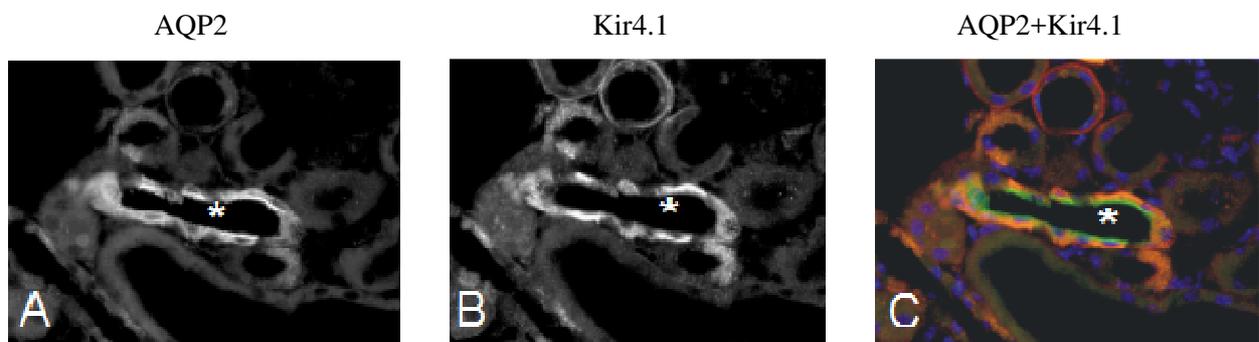


Abbildung 5: Verteilung von Kir4.1 Immunreaktivität im Sammelrohr.

(A-C) Zur Segmentidentifizierung ist eine Doppelmarkierung mit Aquaporin 2 für den CNT, CCD und MCD unter Benutzung verschiedener Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper gezeigt. (A) Aquaporin 2 ist im CCD (Stern) stark vorhanden. (B) Kir4.1 zeigt eine schwächere Expression im CCD. (C) Bildüberlagerung, Aquaporin 2 in grün und Kir4.1 in rot. Vergrößerung ca. x300.

3.2 Lokalisation von THIK-1

3.2.1 THIK-1 Verteilung in der Maus- und Rattenniere

In der In situ Hybridisierung (ISH) in der Mausnieren war das mRNA-Signal von unterschiedlicher Intensität entlang des Nephrons vorhanden. Die Pars recta des PT zeigte ein starkes mRNA-Signal, während die dünnen Schleifenanteile negativ waren (siehe Abbildung 6). In den anschließenden Nephronsegmenten TAL, CNT und CCD war die Färbung für THIK-1 mRNA wieder ausgeprägter zu sehen. Die Macula densa als Teil der aufsteigenden Schleife war auch für THIK-1-mRNA positiv.

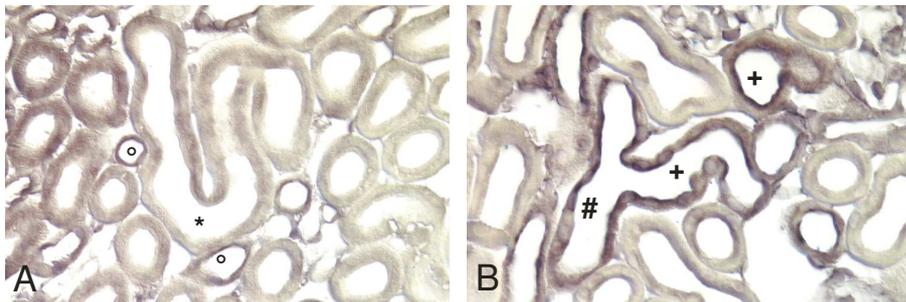


Abbildung 6: Lokalisation von THIK-1 mRNA mittels In situ Hybridisierung in der Mausnieren.

(A) THIK-1 mRNA lässt sich in der Henle'schen Schleife (Kreis) nachweisen. Der Übergang vom Konvolut zur Pars recta des proximalen Tubulus zeigt einen Aktivitätsanstieg (Stern). (B) Die stärkste Expression von THIK-1 mRNA zeigt sich im Verbindungsstück (Plus) und im kortikalen Sammelrohr (Raute). Vergrößerung ca. x300. Mit der freundlichen Genehmigung von Karger Publishers, siehe Anhang.

Die Western Blot- Analyse von isolierten Membranfraktionen von der Maus- und Ratennieren zeigten spezifische Banden bei ca. 50 kDa für THIK-1 (siehe Abbildung 7). Das ist etwas größer als die erwartete Länge von 45,1 kDa. Diese kleine Differenz könnte durch eine unbekannte Modifikation nach der Translation wie zum Beispiel eine Glykosylierung oder Phosphorylierung bedingt sein. Eine Präabsorption des Antikörpers mit dem THIK-1-GST-Fusionsprotein führte zu einem fast vollständigen Erlöschen des spezifischen Signals (siehe Abbildung 7B).

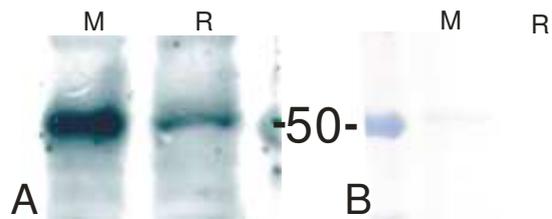


Abbildung 7: Western Blot-Analyse der THIK-1 Expression in Membranfraktionen aus der Maus (M)- und Rattenniere (R). (A) Anti-THIK-1 zeigt starke Banden bei ca. 50 kDa sowohl in der Maus (an der linken Seite) als auch in der Rattenniere (an der rechten Seite). (B) Nach Präinkubation des Antikörpers mit dem entsprechenden GST- Fusionsprotein ist kein spezifisches Signal mehr zu detektieren. Das Molekulargewicht in kDa ist zwischen dem Bild A und Bild B markiert. Mit der freundlichen Genehmigung von Karger Publishers, siehe Anhang.

Preembedding-Färbungen mit dem anti-THIK-1-Antikörper zeigten eine Expression des K^+ -Kanals im PT, im CNT und im CCD der Rattenniere. Das Signal zeigte eine zytosolische Lokalisation in einzelnen Zellen dieser Segmente. Die Schaltzellen, die durch ihre niedrigere Höhe zu erkennen sind, zeigten keine Immunreaktivität für THIK-1 (siehe Abbildung 8).

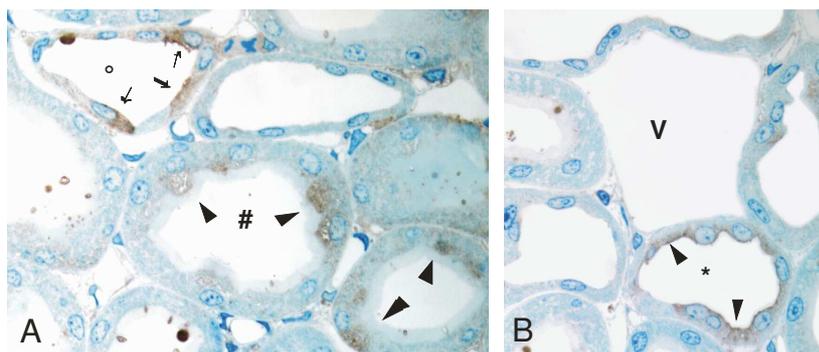


Abbildung 8: Verteilung von THIK-1 in der Rattenniere. (A und B) Immunhistochemische Färbung des THIK-1-Proteins im Kortex der Rattenniere, semidünne Schnitte. (A) Die anti-THIK-1-Antikörper zeigen eine Aktivität im proximalen Tubulus (Raute) und im kortikalen Sammelrohr (Kreis). Einzelne positiv markierte Zellen im proximalen Tubulus (Pfeilkopf) und Hauptzellen des Sammelrohrs (Pfeil) zeigen ein intrazelluläres Signal. (B) THIK-1 wird auch im Verbindungstubulus exprimiert (Stern), daneben eine Vene (V). Die Zellen des CNT (Pfeilkopf) zeigen auch eine ausschließlich intrazelluläre Immunreaktivität. Vergrößerung ca. x300. Mit der freundlichen Genehmigung von Karger Publishers, siehe Anhang.

3.2.2 Lokalisation von THIK-1 in OK-Zellen

Um die Ergebnisse für die THIK-1-Aktivität im proximalen Tubulus zu überprüfen, wurden OK-Zellen verwendet. THIK-1 zeigte eine strenge intrazelluläre Immunreaktivität mit vesikulärem Verteilungsmuster in den OK-Zellen. In der Abbildung 9 (A-D) wurde eine Doppelmarkierung

mit Phalloidin als Aktinfilament-Marker angewandt, um die Konfluenz der einschichtigen Zellkultur zu zeigen. Ersatz des anti-THIK-1-Antikörpers durch PBS erzeugte kein Signal.

Die Western Blot Analyse zeigte eine spezifische Bande für THIK-1 bei ~52 kDa. Bei Vorinkubation des Antikörpers mit dem GST-Fusionsprotein war die Bande vollständig fehlend (siehe Abbildung 9E).

Um die THIK-1-Expression in OK-Zellen zu verifizieren, führten wir zusätzlich eine PCR-Analyse mit DNS-Fragmenten von OK-Zellen durch. Die PCR-Produkte zeigten eine Länge von 388 bp für THIK-1 und 400 bp für THIK-2 und bewiesen damit die Expression von beiden K^+ -Kanälen in den OK-Zellen (Abb. 9F).

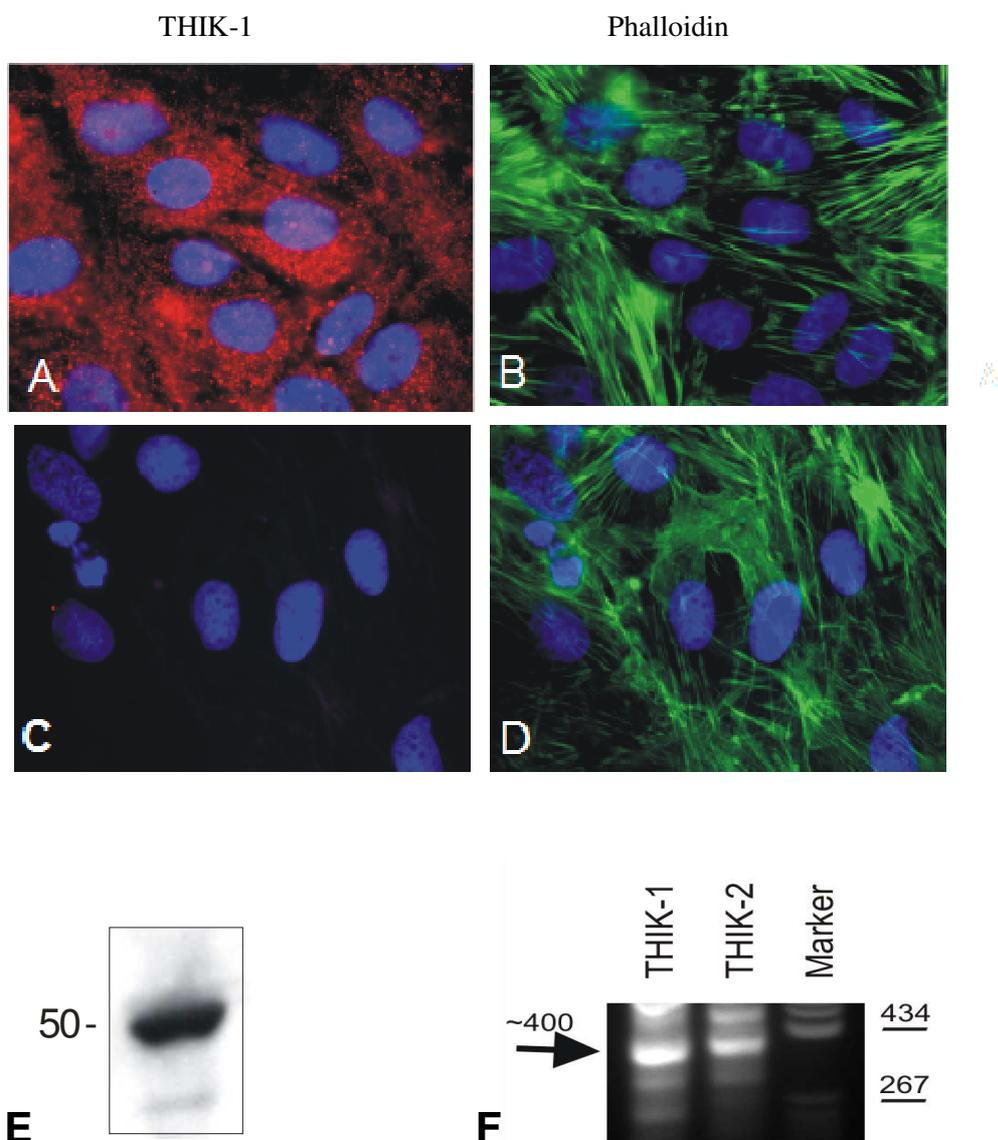
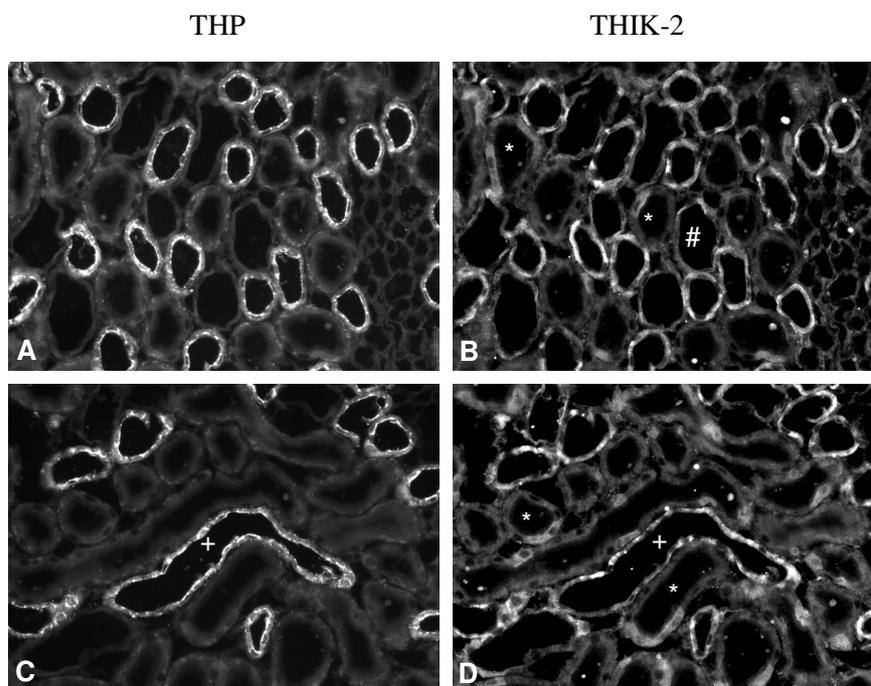


Abbildung 9: Verteilung von THIK-1 in Opossum kidney Zellen (OK-Zellen). (A-D) THIK-1 Expression in OK-Zellen. (A und B) Doppelmarkierung der konfluenten einschichtigen Zellkultur, der Zellkern wurde blau mit DAPI markiert. (A) Der Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper für THIK-1 zeigte ein intrazelluläres Signal

(rot). (B) Das fluoreszierende Phalloidin markiert die Aktinfilamente des Zellskeletts (grün). (C und D) Negativkontrolle durch Vorinkubation des Antikörpers mit dem spezifischen GST-Fusionsprotein, Doppelmarkierung mit Phalloidin (grün). (E) Die Western Blot-Analyse von THIK-1-Expression in OK-Zellen zeigt eine Bande bei 50- 52 kDa Molekulargewicht. (F) RT-PCR Analyse von THIK-1 und THIK-2 Expression in OK Zellen. Der Pfeil zeigt das PCR-Produkt bei der erwarteten Größe von 400 bp. Vergrößerung (A-D) ca. x300. Mit der freundlichen Genehmigung von Karger Publishers, siehe Anhang.

3.3 Lokalisation von THIK-2 in der Maus- und Rattenniere

In der Rattenniere zeigten immunhistochemische Färbungen mit dem anti-THIK-2-Antikörper ein schwaches intrazelluläres Signal in einzelnen Zellen des proximalen Tubulus mit deutlich stärkerer Expression in der Pars recta des Außenstreifens als im kortikalen Anteil des PT (siehe Abbildung 10). Doppelmarkierungen mit dem anti-THP-Antikörper zeigten eine Koexpression des K^+ -Kanals im cTAL und mTAL (siehe Abbildung 10 A-D). Weitere immunhistochemische Doppelfärbungen mit anti-Calbindin als Marker des CNT zeigten eine intrazelluläre Expression von THIK-2 in den Hauptzellen des CNT. Die Schaltzellen, die an der Abwesenheit des Calbindinsignals zu erkennen sind, waren auch THIK-2 negativ (siehe Abbildung 10 E und F).



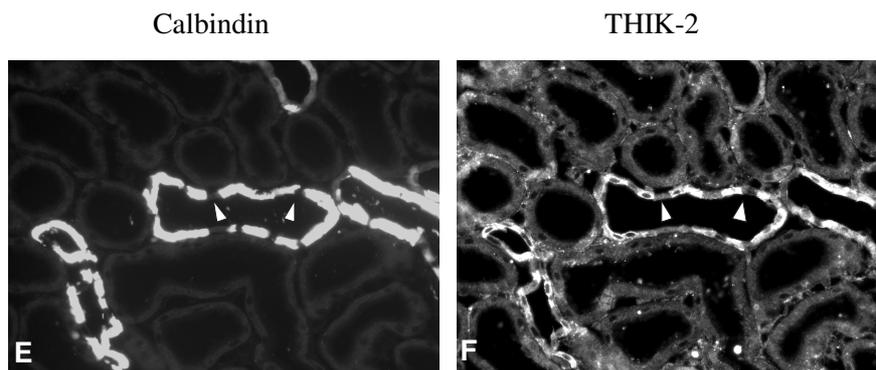


Abbildung 10: Verteilung von THIK-2 in der Rattenniere. (A-D) Doppelmarkierung von THP (A und C) zur Identifikation der Henle'sche Schleife und der THIK-2- Immunreaktivität (B und D). (A) Kennzeichnung von mTAL durch anti-THP-Antikörper. (B) Die THIK-2-Markierung zeigt eine Immunreaktivität in der mTAL zusammen mit dem THP. Zusätzlich angeschnitten positiv markierter proximaler Tubulus (Stern) und Sammelrohr (Raute). (C) Identifikation des kortikalen Anteils der Henle'sche Schleife (Plus) durch immunhistochemische Markierung mit anti-THP. (D) Anti-THIK-2 zeigt ein Signal im cTAL. Der THIK-2-exprimierende proximale Tubulus ist wieder markiert (Stern). (E und F) Doppelmarkierung mit Calbindin D_{28k} (E) als Marker für den Verbindungstubulus und THIK-2 (F). Die Schaltzellen des CNT (Pfeilköpfe in E und F), markiert durch die Abwesenheit von Calbindin D_{28k}, zeigen keine Immunreaktivität für anti-THIK-2 Antikörper. Vergrößerung (A-D) ca. x150, (E-F) ca. x200. Mit der freundlichen Genehmigung von Karger Publishers, siehe Anhang.

In der Mausnieren wurde eine THIK-2-Immunreaktivität in der basolateralen Membran unterschiedlicher Abschnitte des Nephrons vorgefunden. Die THIK-2-Expression war im proximalen Nephron schwächer und nahm im Bereich des distalen Nephrons und des Sammelrohrsystems deutlich an Intensität zu. In der Abbildung 11 wurde das Aktin-Skelett im Bürstensaum der Zellen des proximalen Tubulus mit Phalloidin markiert. Eine Doppelfärbung mit THIK-2 zeigte eine basolaterale Expression des K⁺-Kanals.

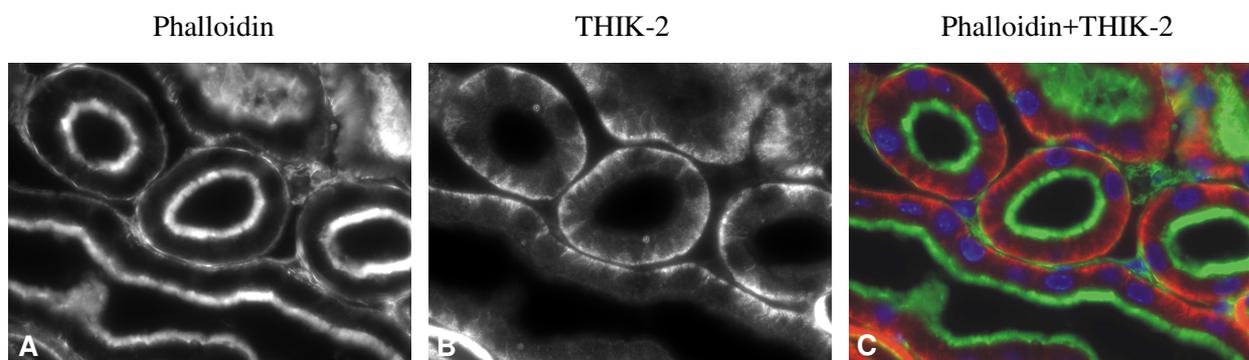


Abbildung 11: Verteilung von THIK-2 in der Mausnieren. (A-C) Zur Segmentidentifizierung wurde eine Doppelmarkierung mit fluoreszierendem Phalloidin durchgeführt. (A) Fluoreszierendes Phalloidin markiert die Aktinfilamente im Bürstensaum der Zellen des PT. (B) THIK-2 zeigt eine basolaterale Expression entlang des PT.

(C) Bildüberlagerung, Phalloidin in grün und THIK-2 in rot. Vergrößerung ca. x300. Mit der freundlichen Genehmigung von Karger Publishers, siehe Anhang.

Im anschließenden mTAL und cTAL blieb das THIK-2-Signal streng basolateral und nur in der äußeren Medulla verteilt. Die Macula densa zeigt keine THIK-2-Expression. Die TAL-Zellen wurden mit dem segmentspezifischen NKCC2 markiert. (siehe Abbildung 12 A-F).

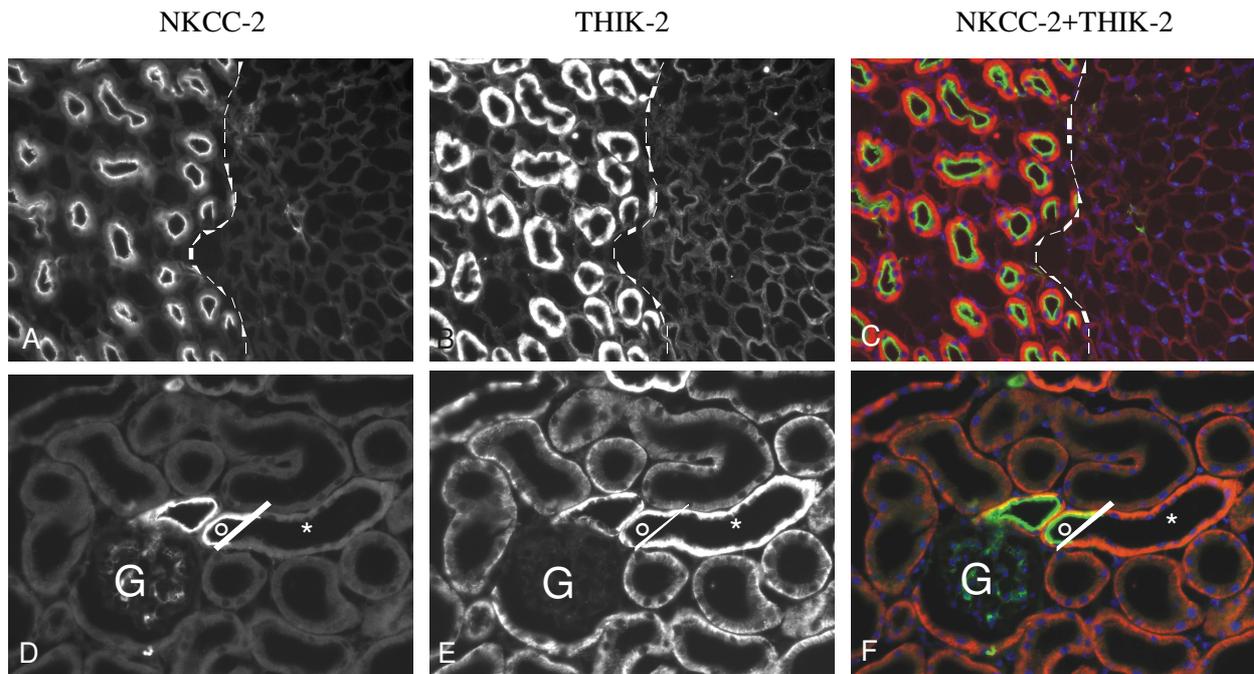


Abbildung 12: Verteilung von THIK-2 im TAL der Mausniere. (A-F) Zur Segmentidentifizierung wurde eine Doppelmarkierung mit NKCC-2 für den TAL vorgenommen. (A-C) Darstellung des mTAL, die gestrichelte Linie bezeichnet die Grenze zwischen der inneren und der äußeren Medulla. (A) NKCC-2 wird an der luminalen Zellseite im TAL exprimiert. (B) THIK-2 zeigt auch im cTAL eine basolaterale Immunreaktivität. (C) Bildüberlagerung, NKCC-2 in grün und THIK-2 in rot. (D-F) Übergang vom cTAL (Kreis) in DCT (Stern). G markiert den Glomerulus. (D) NKCC-2- Expression wird in der Macula densa exprimiert und hört mit dem Beginn des DCT auf. (E) Das basolaterale THIK-2-Signal setzt sich auch im distalen Convolut fort. In der Macula densa ist kein Signal für THIK-2 zu sehen. (F) Bildüberlagerung, NKCC-2 in grün und THIK-2 in rot. Vergrößerung (A-C) ca. x100, (D-F) ca. x200. Mit der freundlichen Genehmigung von Karger Publishers, siehe Anhang.

Eine starke THIK-2 Expression zeigte sich weiterhin im CNT (siehe Abbildung 13). Entlang des Sammelrohrs nahm die Intensität des basolateralen THIK-2-Signals kontinuierlich ab. Die Schaltzellen der CNT und CD zeigten keine spezifische Markierung.

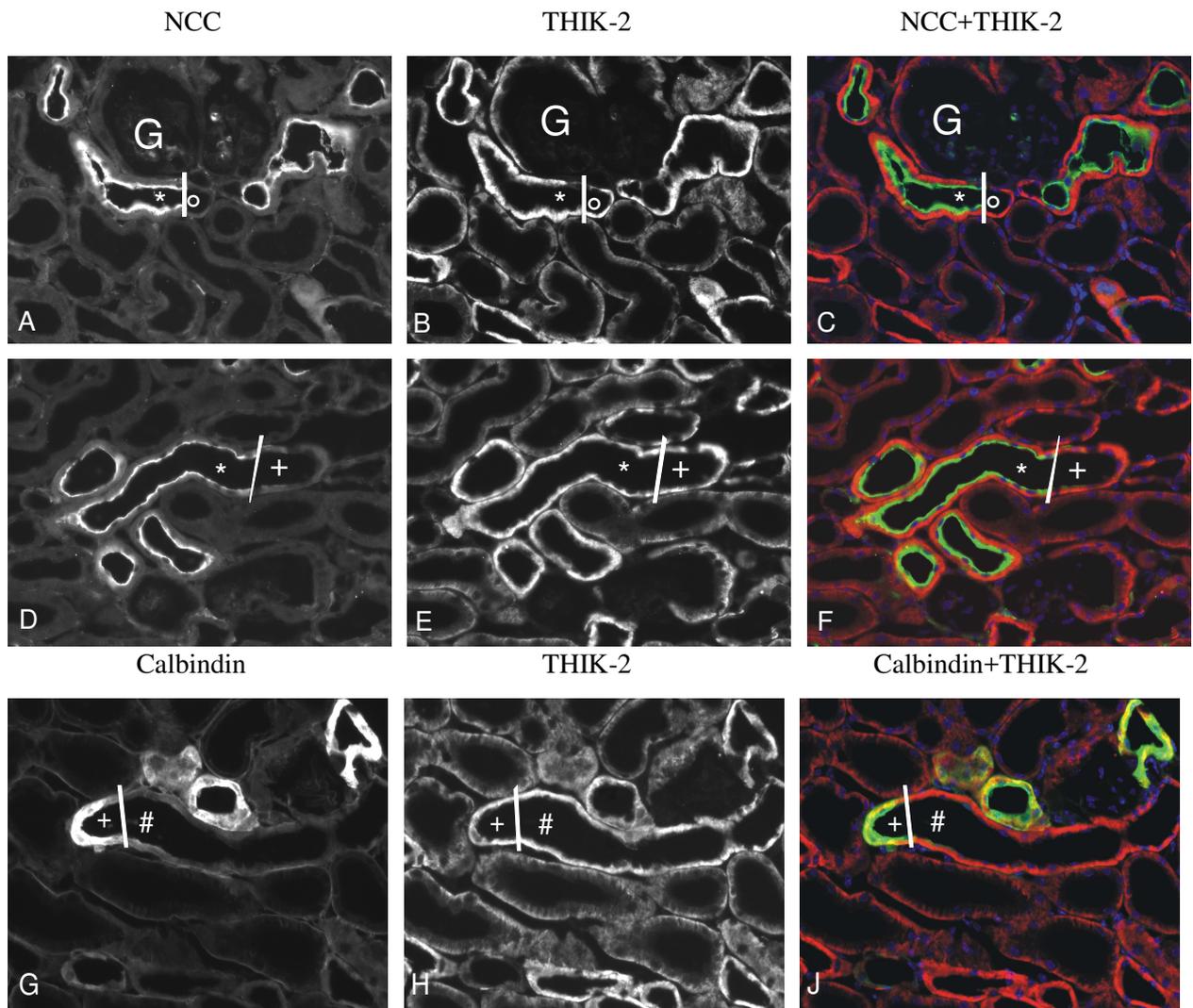


Abbildung 13: Verteilung von THIK-2 Immunreaktivität im CNT und CD. Zur Segmentidentifizierung wurde Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung mit anti-NCC (A-F) und anti-Calbindin D_{28k} (G-J) vorgenommen. (A-C) Übergang vom cTAL (Kreis) in den DCT (Stern), G markiert den Glomerulus. Der Beginn der NCC Expression an der luminalen Zellseite markiert den Übergang vom cTAL (Kreis) in den DCT (Stern). (B) THIK-2 zeigt eine gleichbleibende Expressionsstärke an der basolateralen Seite der beiden Nephronabschnitte. (C) Bildüberlagerung, NCC in grün und THIK-2 in rot. (D-F) Übergang vom distalen Konvolut (Stern) in den Verbindungstubulus (CNT, Plus). (D) Der apikal verteilte NCC endet am Übergang in den CNT. (E) Die THIK-2-Färbung setzt sich mit gleichbleibender Signalintensität in den CNT fort. (F) Bildüberlagerung, NCC in grün und THIK-2 in rot. (G-J) Übergang vom Verbindungstubulus (Plus) in das kortikale Sammelrohr (CCD, Raute). (G) Die Calbindin D_{28k}-Expression bricht am Übergang in den CCD ab. (H) Das basolaterale THIK-2-Signal nimmt im Sammelrohr geringfügig an Intensität ab. (J) Bildüberlagerung, Calbindin in grün und THIK-2 in rot. Vergrößerung ca. x200. Mit der freundlichen Genehmigung von Karger Publishers, siehe Anhang.

Zur Bestätigung der immunhistochemischen Ergebnisse wurden zusätzlich In situ Hybridisierung Experimente (ISH) an Paraffinschnitten von Mausnieren durchgeführt. Ein schwaches Signal für THIK-2-mRNA wurde im PT vorgefunden. Ein Anstieg der Intensität zeigte sich im

Außenstreifen. Die stärksten Expressionsmuster zeigten sich im distalen Nephronsegment, im Verbindungstubulus und im kortikalen Sammelrohr (siehe Abbildung 14). Damit bestätigten sich die Ergebnisse der immunhistochemischen Versuche.

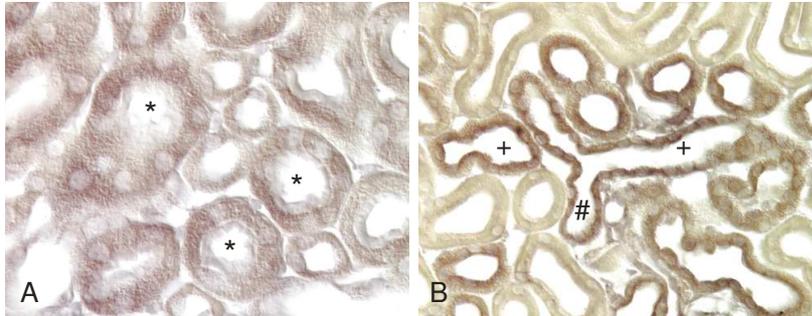


Abbildung 14: Verteilung der THIK-2-mRNA in der Mausniere durch In situ Hybridisierung. (A) THIK-2 mRNA wurde im proximalen Tubulus (Stern), (B) im Verbindungstubulus (Plus) und im Sammelrohr (Raute) exprimiert. Vergrößerung (A) ca. x300, (B) ca. x200. Mit der freundlichen Genehmigung von Karger Publishers, siehe Anhang.

Die Western blot-Analyse zeigte eine Expression des THIK-2 in der Maus- und Rattenniere (siehe Abbildung 15 A). Die spezifischen Banden hatten ein Molekulargewicht von ca. 49 kDa und waren damit, ähnlich wie bei THIK-1, etwas größer als die erwarteten 47 kDa. Die Vorinkubation des Antikörpers mit dem entsprechenden GST-Fusionsprotein führte zu starker Signalreduktion (siehe Abbildung 15 B).

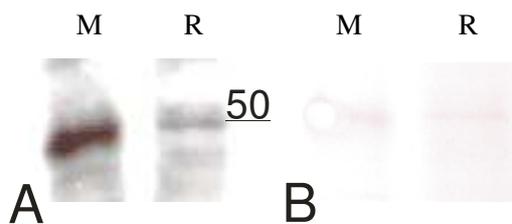


Abbildung 15: (A) Western Blot-Analyse der THIK-2-Expression in der Maus (M)- und Rattenniere (R). Der Kaliumkanal wird in beiden Spezies exprimiert bei ca. 50 kDa. (B) Eine Vorabsorption des anti-THIK-2-Antikörpers mit dem spezifischen FSG-Fusionsprotein führt zur starken Reduktion des Signals. Das Molekulargewicht in kDa ist zwischen den beiden Bildern angezeigt. Mit der freundlichen Genehmigung von Karger Publishers, siehe Anhang.

4 Diskussion

4.1 Expression und Funktion von Kir4.1

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Kir4.1, einem K⁺-Kanal aus der Familie der *inward rectifier*, in der Mausniere untersucht. Es wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen zur segmentspezifischen Lokalisation von Kir4.1 verwendet. Diese Analysen ergaben, dass der K⁺-Kanal in der basolateralen Membran der Epithelzellen lokalisiert ist. Der Kir4.1 konnte im medullären und kortikalen dicken aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife, im distalen Konvolut, im Verbindungstubulus und im kortikalen Sammelrohr nachgewiesen werden. Im CNT und CCD zeigte ein Teil der Zellen keine Expression, diese entsprachen morphologisch den Schaltzellen. Die Hauptzellen dagegen waren immunreaktiv. Die Signalintensität entlang des Nephrons war sehr unterschiedlich. Die Immunreaktivität beginnt im mTAL und setzt sich in den cTAL fort. DCT und CNT zeigten eine intensive Färbung, welche am Übergang zum CCD wieder schwächer wurde.

Das hier gezeigte renale Expressionsmuster von Kir4.1 ergänzt die Ergebnisse früherer Studien [16,26]. Ito et. al. verwendeten in ihrer Arbeit ebenfalls immunhistochemische Methoden an ultradünnen Schnitten. Sie zeigten ein spezifisches Signal für Kir4.1 nur in den distalen Nephronabschnitten der kortikalen Zone und im kortikalen Sammelrohr der Rattenniere. Eine Immunreaktivität des Kaliumkanals Kir4.1 fand sich an der basolateralen Seite des Nierenepithels ausschließlich in den Segmenten des DCT, CNT und dem beginnenden CCD. Im Verbindungstubulus und im Sammelrohr waren die Schaltzellen ohne Signal [16]. Eine spätere Studie zeigte ein schwaches immunhistochemisches Signal für Kir4.1 auch im kortikalen und im medullären TAL [26]. Mit der vorliegenden Arbeit wird die im Vergleich zu DCT und CNT etwas schwächere Expression von Kir4.1 in der Henle'schen Schleife bestätigt. Im distalen Nephron wurde ein fluoreszierendes Signal nicht nur im Anfangsteil vom CCD, sondern auch im gesamten kortikalen Sammelrohr bis zum Übergang in das medulläre Sammelrohr, an der Grenze zwischen Kortex und Medulla vorgefunden.

Im distalen Konvolut ist Kir4.1 der wichtigste Kanal für die Kaliumleitfähigkeit an der basolateralen Membran [27]. Zhang et al. verwendeten *patch clamp* Versuche in DCT-Zellen von homozygoten *Knockout*-Mäusen für Kir4.1 (KCNJ10^{-/-}), von heterozygoten *Knockout*- (KCNJ10^{+/-}) und von Wildtyp-Mäusen (KCNJ10^{+/+}). Der 40-pS Kaliumkanal konnte in 23 von insgesamt 32 *patches* an der basolateralen Membran der DCT-Zellen in den Wildtyp-Tieren registriert werden. In den heterozygoten Mäusen wurde der Kanal nur noch in 9 von 22 *patches*

gefunden. In den $KCNJ10^{-/-}$ Tieren konnte Kir4.1 in keinem der 32 *patches* registriert werden. Außerdem wurde bei den homozygoten *Knockout*-Mäusen überhaupt keine Kaliumkanalaktivität an der basolateralen Membran aufgenommen, so dass daraus abzuleiten ist, dass Kir4.1 die Hauptrolle für die Kaliumleitfähigkeit der basolateralen Membran in den Epithelzellen des distalen Konvoluts spielt. Das Fehlen von Kir4.1 in den homozygoten *Knockout*-Tieren wurde auch immunhistochemisch bestätigt [27].

Die Hauptfunktion der Kaliumkanäle an der basolateralen Zellmembran der Nierenepithelien ist die Rezirkulation von Kaliumionen ins Interstitium, die durch die Na^+ - K^+ -ATPase in die Zelle hinein transportiert worden sind [1]. Eine Störung dieser Funktion führt zur Depolarisation der basolateralen Zellmembran. Damit wird die treibende Kraft für die spannungsabhängigen Transporter wie Chloridkanäle, Na^+ / Ca^{2+} -Austauscher und vermutlich auch Na^+ / Mg^{2+} -Austauscher abgeschwächt und die Resorption der Ionen im Nephron herabgesetzt [28]. *Patch clamp* Untersuchungen in DCT-Zellen von homozygoten *Knockout*-Mäusen für Kir4.1 zeigten eine deutliche Erhöhung des Membranpotentials von -65 mV auf -39 mV [27]. Eine schwächere Depolarisation der Zellmembran wurde in heterozygoten $KCNJ10^{+/-}$ Mäusen beschrieben (ca. -57mV). In der Arbeit wurde auch der Chloridfluss an ganzen Zellen gemessen. In den homozygoten *Knockout*-Mäusen war der Cl^- Strom signifikant reduziert im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren: von -1750 mA bei dem $KCNJ10^{+/+}$ auf nur -460 mA bei den $KCNJ10^{-/-}$ (bei -60 mV). Damit bestätigte sich, dass das Fehlen von Kir4.1 die Aktivität der Chloridkanäle im DCT stark reduziert.

Eine Mutation des $KCNJ10$ -Gens mit der entsprechenden Funktionsverschlechterung des Kaliumkanals führt zu dem so genannten EAST- oder SeSAME-Syndrom [29, 30]. Dieses autosomal rezessiv vererbte Syndrom beinhaltet eine frühkindliche Epilepsie, Ataxie, Schwerhörigkeit und eine renale Dysfunktion mit Salzverlust (EAST). Unter dem SeSAME-Syndrom ist zusätzlich eine mentale Retardierung beschrieben worden, wobei dieses Symptom nicht von allen Autoren gefunden wird (R. Kleta, London, persönliche Kommunikation). Die renalen Symptome der $KCNJ10$ -Mutation ähneln denen des Gitelman-Syndroms, einer Mutation des NCC -Transporters im DCT [31]. Die Patienten leiden unter Hypokaliämie, Alkalose und Hypomagnesiämie. Im Urin ist eine erhöhte Ausscheidung von Natrium, Kalium und Magnesium nachweisbar, wobei die Ausscheidung von Kalzium normal ist. Die Konzentrationsfähigkeit der Niere bleibt erhalten, so dass die Patienten keine relevante Polyurie zeigen [28]. Durch die gestörte Funktion des Kir4.1-Kanals bei den EAST/SeSAME-Patienten wird der Kaliumausstrom an der Basolateralmembran der distalen Nephronepithelzellen reduziert. Das führt zur Verminderung der Aktivität der Na^+ / K^+ -ATPase

und dadurch zur Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration. Die hohe Na^+ -Konzentration in den DCT-Zellen senkt die treibende Kraft für den NaCl -Kotransport in der apikalen Zellmembran über dem NCC. Die Resorption von NaCl im frühen distalen Konvolut wird damit reduziert. Der resultierende Salzverlust führt zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und steigert dadurch die Aktivität des Amilorid-sensitiven epithelialen Natriumkanals (ENaC) in der apikalen Zellmembran von DCT, CNT und im CD. Es kommt zu einer Steigerung der Natriumresorption in diesen Tubulussegmenten. Diese Natriumresorption im späten DCT, CNT und CCD ist verbunden mit einer gesteigerten Sekretion von K^+ und H^+ in den Urin und resultiert in einer hypokaliämischen metabolischen Alkalose [28]. Bei allen EAST/SeSAME-Patienten, bei denen die Werte bestimmt wurden, konnte eine erhöhte Reninaktivität im Plasma und erhöhte Aldosteronwerte im Sammelurin nachgewiesen werden [29]. Der genaue molekulare Mechanismus der reduzierten Resorption von Magnesium im DCT ist nicht bekannt. Ein Zusammenhang zwischen der reduzierten NaCl -Resorption in der apikalen Membran und der niedrigeren Aktivität des apikalen Magnesiumkanals TRPM6 wird vermutet. Eine zweite mögliche Ursache für die Hypermagnesiurie stellt die Depolarisation der basolateralen Membran und die dadurch reduzierte Triebkraft für den Mg^{2+} -Transport ins Interstitium dar [28]. Auch wenn makroskopisch im Ultraschall die Nieren von EAST/SeSAME-Patienten unauffällig aussehen, zeigen die Zellen des distalen Konvoluts unter dem Elektronenmikroskop deutlich weniger Mitochondrien und Einfaltungen der Basolateralmembran als Zeichen des reduzierten Ionentransports [29].

Bisher wurden insgesamt 8 unterschiedliche homo- und heterozygote Mutationen des KCNJ10-Gens beschrieben [32]. Alle nachgewiesenen Mutationen, außer bei der R199X-Mutation, führten zum Austausch einer Aminosäure und damit zur Störung der Funktion des Kir4.1-Kaliumkanals. Bei den unterschiedlichen Mutationen wurde auch im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine unterschiedlich ausgeprägte Reduktion des Kaliumflusses der gesamten Zelle beschrieben-von 0% bis 23% [33]. Für drei der Mutationen (G77R, C140R und A167V) konnte mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen in HEK293-Zellkultur eine niedrigere Expression von Kir4.1 in der Zelloberfläche als mögliche Ursache für die gestörte Kanalfunktion gezeigt werden. Die Unterschiede zwischen den Mutationen erklären die große Bandbreite der Symptome der EAST/ SeSAME-Patienten und die sehr unterschiedliche Lebenserwartung dieser Patienten [29]. Bei der R199X-Mutation kommt es durch den vorzeitigen Einbau eines Stopcodons zu einem verkürzten KCNJ10-Protein, welches keine Kanalfunktion zeigt. Bei diesen Zellen lässt sich dementsprechend kein Kaliumfluss nachweisen [32]. Homozygoten

Knockout-Mäuse (KCNJ10^{-/-}) waren 7 Tage nach der Geburt deutlich unterentwickelt und hatten ein niedrigeres Gewicht im Vergleich zu heterozygoten *Knockout*- (KCNJ10^{+/-}) oder Wildtyp- (KCNJ10^{+/+}) Tieren. Die KCNJ10^{-/-} Mäuse überlebten nicht länger als 2 Wochen. Die häufigste Ursache für den letalen Verlauf waren die ZNS-Symptome, vor allem die Epilepsie [27].

In einem weiteren *patch clamp* Experiment konnte gezeigt werden, dass Dopamin die Öffnungswahrscheinlichkeit von Kir4.1 im CCD reduziert und dadurch die Kaliumrezirkulation an der basolateralen Zellmembran vermindert [34]. Die Versuchsergebnisse von Zaika et al. zusammen mit der Beobachtung, dass die meisten EAST/ SeSAME Patienten einen niedrigen Blutdruck haben [29], führten zu der Schlussfolgerung, dass durch die Inhibierung von Kir4.1 neue pharmakologische Ansatzpunkte für die Bluthochdrucktherapie entwickelt werden können [35].

Eine andere Funktion des Kir4.1 ist im Zusammenhang mit Elektrolytstörungen beim akuten Nierenversagen beschrieben worden [36]. In einer Arbeit von Sgard et al. wurden beide Nierenarterien von Ratten für 30 min abgeklemmt. Danach wurden die Tiere in vier Gruppen unterteilt: die Nieren wurden nach je 2, 6, 24 Stunden und 5 Tagen nach der Reperfusion entnommen und für Northern blot-Analysen weiter bearbeitet. Parallel wurden mehrfach der Kreatinin- und Harnstoffwert im Blut zur Überwachung der aufgetretenen akuten Niereninsuffizienz nach warmer Ischämie kontrolliert. Es wurden der höchste Kreatininwert (14fach erhöht) 24h und der höchste Harnstoffwert (11fach erhöht) sogar erst 48h nach der Reperfusion gemessen. Beide Parameter waren nach 5 Tagen deutlich rückläufig, aber immer noch über den Normalwerten (entsprechend 2 und 3fach). Die Reduzierung der Kir4.1-Expression in der Rattenniere, gemessen in Northern blot-Analysen, begann schon 6h nach der warmen Ischämie. Nach 24h reduzierte sich die mRNA auf ein Viertel. Auch nach 5 Tagen erholte sich die Kir4.1-Expression nicht, obwohl die Gesamtnierenfunktion gemessen an den Blutparametern Kreatinin und Harnstoff wieder nahezu normal war. Vermutlich besteht im Rahmen der akuten Niereninsuffizienz z.B. nach Ischämie oder bei Volumenmangel ein Zusammenhang zwischen dem Kir4.1-Verlust und dem vermehrten Kaliumverlust im Urin.

4.2 Expression und Funktion von THIK-1 und THIK-2

Die anderen zwei in dieser Studie untersuchten Kaliumkanäle, THIK-1 und THIK-2, gehören zu der Gruppe der 2-Poren-Kaliumkanäle. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass K_{2P}-Kanäle im Nephron verteilt sind [19,21,37]. In der vorliegenden Arbeit wurde THIK-1 anhand von

immunhistochemischen Markierungen vom proximalen Tubulus bis zum Sammelrohr lokalisiert. THIK-2 dagegen zeigte eine Immunreaktivität nur im distalen Nephron. Beide Kanäle waren in der Macula densa exprimiert. Unterschiede im Expressionsmuster der beiden Kaliumkanäle waren zwischen Maus und Ratte detektierbar. THIK-2 war in der Mausnieren in der basolateralen Membran lokalisiert. In der Rattenniere jedoch waren sowohl THIK-1 als auch THIK-2 intrazellulär lokalisiert.

Chatelain et al. bestätigten 2013 die intrazelluläre Verteilung von THIK-2 [38]. Immunhistochemische Färbungen zeigten eine intrazelluläre Ko-Expression von THIK-2 und Calreticulin, ein Marker des endoplasmatischen Retikulums (ER). Damit konnte eine „Speicherung“ des Kaliumkanals im ER nachgewiesen werden. Der N-Terminus des THIK-2-Proteins ist sehr ungewöhnlich aufgebaut und enthält 10 Arginin-Reste. Ein Teil davon bildet ein Muster, welches auch bei anderen Kanälen wie K_{ATP} , für die Verankerung im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich ist [38, 25]. Verschiedene Mutationen im Bereich des N-Terminus führten zum verstärkten Transport des THIK-2-Kanals an die Zelloberfläche, wie immunhistochemisch nachgewiesen. Auf der Zelloberfläche konnte dann auch ein Kaliumfluss über den THIK-2-Kanal gemessen werden, auch ohne die Porenstruktur zu verändern [25]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass THIK-2 im Zellinneren als inaktiver Speicherpool vorliegt, um seine Funktion nach Stimulation in der Zellmembran zu entwickeln [25,38]. Dies ist für Transportproteine nicht ungewöhnlich. Besonders im kortikalen Sammelrohr konnte für den ROMK, den Amilorid-sensitiven Natriumkanal ENaC und den Wasserkanal Aquaporin-2 sowohl eine intrazelluläre Verteilung als auch Lokalisation in der Zellmembran nach Stimulation gezeigt werden [39,40,41,42,43]. Die intrazelluläre „Speicherung“ der Kanäle dient dabei der schnellen Antwort auf die Bedürfnisse des Körpers. Vermutlich wird auch THIK-2 vom seinem intrazellulären Speicher bei einer Stimulation in die basolaterale Membran transportiert. Die genauen Regulationsmechanismen für diesen Prozess sind noch unbekannt.

Über die physiologische Rolle von THIK-1 und THIK-2 ist ebenfalls wenig bekannt. Studien über die Funktion von THIK-1 haben gezeigt, dass in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) der Kaliumfluss über den THIK-1 durch Arachidonsäure gesteigert und durch Hypoxie reversibel inhibiert wurde, was zu einer Depolarisation der Zellmembran führte [24]. Im großen Unterschied zu anderen sauerstoffabhängigen Kaliumkanälen wie TASK-1 geschah die hypoxische Inhibierung von THIK-1 unabhängig von Sauerstoffradikalen oder der mitochondrialen Respiration. Der Ionenstrom änderte sich in *patch clamp* Analysen nach Hemmung der Mitochondrien mit Rotaton, Myxothiazol oder Natriumcyanid sowohl unter Kontroll- als auch unter hypoxischen Bedingungen nicht. In Anbetracht der

Sauerstoffempfindlichkeit und der Expression der THIK-Kanäle im PT und TAL wird angenommen, dass sie an der Regulation des reduzierten Na^+ - und Cl^- -Transportes in diesen Nephronsegmenten unter hypoxischen Bedingungen beteiligt sind. Untersuchungen in Kaninchen zeigten, dass nach 60 min Ischämie der Niere der Na^+ -abhängige Transport von Glukose und Phosphat im Bürstensaum des proximalen Tubulus inhibiert wird. 60 min nach der Reperfusion wurden keine Unterschiede gemessen [44].

THIK-1 zeigte auch eine Empfindlichkeit gegen Kälte. In *Patch clamp* Versuchen wurde bei 10°C eine Reduktion der Kanalaktivität um 80% gemessen. Der Strom der Gesamtzelle wurde um ca. 50% reduziert [45].

Die Macula densa ist an der Steuerung des tubuloglomerulären Rückkopplungs- oder Feedbackmechanismus (TGF) beteiligt [46]. Die MD-Zellen können Änderungen in den Na^+ - und Cl^- -Konzentration der Tubulusflüssigkeit wahrnehmen. Eine Erhöhung der luminalen NaCl -Konzentration an der Macula densa führt durch eine Veränderung des Wandtonus der afferenten Arteriolen und damit auch des Strömungswiderstandes zur Reduzierung der Filtrationsrate am Glomerulum. *Patch clamp* Messungen haben gezeigt, dass die luminalen Kaliumkanäle in der Macula densa ähnliche biophysikalische Eigenschaften besitzen wie die des TAL. Sie werden durch azidotische pH-Werte und hohe Kalziumkonzentrationen intrazellulär inhibiert. Im Gegenteil zum ROMK sind aber die Macula densa-Kaliumkanäle unempfindlich gegen ATP und können nicht durch cAMP aktiviert werden [47]. In dieser Arbeit zeigten wir, dass THIK-1 in den MD-Zellen exprimiert wird, er könnte eine Schlüsselrolle im Regulationsmechanismus der Macula densa spielen.

THIK-2 gehört zu den so genannten „stillen“ Kaliumkanälen, zusammen mit vier weiteren Vertretern der Familie der 2-Poren-Kaliumkanäle: TWIK-1, TWIK-2, KCNK7 und TASK-5. Sie zeigen keinen Kaliumfluss [48]. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass verschiedene Mutationen in der Proteinstruktur von THIK-2 den Kanal aktivieren [25,38]. Der Ersatz z.B. von einer Aminosäure in der M2-Helix von THIK-2 (Alanin in der Position 155) durch Prolin führte zur Steigerung des Kaliumflusses und ermöglichte dadurch die Untersuchung der physiologischen Eigenschaften des THIK-2-Kaliumflusses. Bei einer Kombination der Mutation in der Porenstruktur zusammen mit einer Mutation des N-Terminus, führte zu einer 12-fachen Steigerung des Kaliumflusses über THIK-2 [25].

In *Patch clamp* Experimenten wurde demonstriert, dass unter physiologischen Bedingungen THIK-2 einen Kaliumeinstrom vermittelte, der dem THIK-1-Kaliumfluss sehr ähnlich war und mit Halothan und Chinidin inhibiert werden konnte. In einer Lösung mit hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration konnte dagegen ein Kaliumausstrom nachgewiesen werden. Im

Unterschied zu THIK-1 konnte THIK-2 mit Arachidonsäure nicht aktiviert werden. Eine Veränderung des extrazellulären pH-Wertes zeigte keinen Einfluss auf die Funktion der beiden Kaliumkanäle [25].

THIK-1 ist im ganzen Körper verteilt, seine Expression ist aber im Gehirn im Vergleich zu anderen K_{2P} -Kaliumkanälen schwächer [49]. THIK-2 wird im Gegensatz dazu nur in den Neuronen des Neocortex, des Cerebellums, des Hypokampus, der Nuklei des Thalamus und anderer Gehirnteile exprimiert und zeigt hier ein starkes Signal [24]. Außerhalb des ZNS ist seine Expression deutlich schwächer ausgeprägt.

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper gegen THIK-1 und THIK-2 zeigten im Nierengewebe sowohl von Maus als auch von Ratte eine sehr schwache Reaktivität, so dass sie hochkonzentriert aufgetragen werden mussten und auch aufwendigere Methoden verwendet wurden, um das Signal deutlich identifizieren zu können. Nach Präinkubation der Antikörper mit dem entsprechenden Protein zeigte sich kein Signal bei der Immunhistochemie, so dass, wenn auch schwach, das Signal in der Niere spezifisch für THIK-1 und THIK-2 war. Dieser Umstand lässt den Schluss zu, dass das Expressionslevel der beiden Kanalproteine in der Niere deutlich unter dem im ZNS liegt. Die Frage, in welchem Ausmaß die beiden Kanalproteine zur Funktion der renalen Epithelien beitragen bleibt weiter offen und muss in weiteren Studien geklärt werden.

Literaturverzeichnis

- 1 Silbernagl S: Die Funktion der Niere. In: Klinker R, Silbernagl S, eds. Lehrbuch der Physiologie. 4th ed. Stuttgart: Thieme, 2004;287-364.
- 2 Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev* 2005;85:319-71.
- 3 Arroyo JP, Ronzaud C, Lagnaz D, Staub O, Gamba G. Aldosterone paradox: differential regulation of ion transport in distal nephron. *Physiology (Bethesda)*. 2011;26(2):115-23.
- 4 Kriz W, Bankir L. A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). *Kidney Int*. 1988 Jan;33(1):1-7.
- 5 Rocha AS, Kokko JP. Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle. Evidence for active chloride transport. *J Clin Invest*. 1973 Mar;52(3):612-23.
- 6 Helber A, Meyer D, Schürholz J, Bohle A. Structure and function of the juxtaglomerular apparatus. Quantitative light-optical studies on juxtaglomerular apparatus and macula densa of kidneys from patients with primary hyperaldosteronism, renal artery stenosis, pseudo-Bartter-syndrome and morbus Addison. *Dtsch Med Wochenschr*. 1970 Nov 6;95(45):2280-8.
- 7 Sikri KL, Foster CL, MacHugh N, Marshall RD. Localization of Tamm-Horsfall glycoprotein in the human kidney using immuno-fluorescence and immuno-electron microscopical techniques. *J Anat*. 1981 Jun;132(Pt 4):597-605.
- 8 Masilamani S1, Wang X, Kim GH, Brooks H, Nielsen J, Nielsen S, Nakamura K, Stokes JB, Knepper MA. Time course of renal Na-K-ATPase, NHE3, NKCC2, NCC, and ENaC abundance changes with dietary NaCl restriction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Oct;283(4):F648-57.

- 9 Sands JM, Naruse M, Jacobs JD, Wilcox JN, Klein JD. Changes in aquaporin-2 protein contribute to the urine concentrating defect in rats fed a low-protein diet. *J Clin Invest.* 1996 Jun 15;97(12):2807-14.
- 10 Greger R, Schlatter E. Milestones in nephrology. Presence of luminal K⁺, a prerequisite for active NaCl transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:1788-1793.
- 11 Nichols CG, Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* 1997;59:171-91.
- 12 Takumi T, Ishii T, Horio Y, Morishige K, Takahashi N, Yamada M, Yamashita T, Kiyama H, Sohmiya K, Nakanishi S. A novel ATP- dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J Boil Chem* 1995;270(27):16339-46.
- 13 Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, Kurachi Y. An inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C922–C931.
- 14 Kofuji P, Newman EA. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience.* 2004;129(4):1045-56.
- 15 Chever O, Djukic B, McCarthy KD, Amzica F. Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *J Neurosci.* 2010 Nov 24;30(47):15769-77.
- 16 Ito M, Inanobe A, Horio Y Hibino H, Isomoto S, Ito H, Mori K, Tonosaki A, Tomoike H, Kurachi Y. Immunolocalization of an inwardly rectifying K⁺ channel, KAB-2 (Kir4.1), in the basolateral membrane of renal distal tubular epithelia. *FEBS Lett* 1996;388(1):11-5.
- 17 Hurst AM, Duplain M, Lapointe JY. Basolateral membrane potassium channels in rabbit cortical thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1992;263:262-67.
- 18 Enyedi P, Czirják G. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev.* 2010 Apr;90(2):559-605.

- 19 Cluzeaud F, Reyes R, Escoubet B, Fay M, Lazdunski M, Bonvalet JP, Lesage F, Farman N. Expression of TWIK-1, a novel weakly inward rectifying potassium channel in rat kidney. *Am J Physiol*. 1998;275:C1602-C1609.
- 20 Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J*. 1996;15:1004-1011.
- 21 Orias M, Velazquez H, Tung F, Lee G, Desir GV. Cloning and localization of a double-pore K channel, KCNK1: exclusive expression in distal nephron segments. *Am J Physiol*. 1997;273:F663-F666.
- 22 Reyes R, Duprat F, Lesage F, Fink M, Salinas M, Farman N, Lazdunski M. Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J Biol Chem*. 1998;273:30863-30869.
- 23 Warth R, Barriere H, Meneton P, Bloch M, Thomas J, Tauc M, Heitzmann D, Romeo E, Verrey F, Mengual R, Guy N, Bendahhou S, Lesage F, Poujeol P, Barhanin J. Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:8215-8220.
- 24 Rajan S, Wischmeyer E, Karschin C, Preisig-Müller R, Grzeschik K-H, Daut J, Karschin A, Derst C. THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J Biol Chem*. 2001;276:7302-7311.
- 25 Renigunta V¹, Zou X, Kling S, Schlichthörl G, Daut J. Breaking the silence: functional expression of the two-pore-domain potassium channel THIK-2. *Pflugers Arch*. 2014 Sep;466(9):1735-45.
- 26 Tanemoto M, Abe T, Onogawa T, Ito S. PDZ binding motif- dependent localization of K⁺ channel on the basolateral side in distal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:1148-53.
- 27 Zhang C, Wang L, Zhang J, Su XT, Lin DH, Scholl UI, Giebisch G, Lifton RP, Wang WH. KCNJ10 determines the expression of the apical Na-Cl cotransporter (NCC) in the early distal convoluted tubule (DCT1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Aug 12;111(32):11864-9.

- 28 Bandulik S, Schmidt K, Bockenhauer D, Zdebik AA, Humberg E, Kleta R, Warth R, Reichold M. The salt-wasting phenotype of EAST syndrome, a disease with multifaceted symptoms linked to the KCNJ10 K⁺ channel. *Pflugers Arch*. 2011 Apr;461(4):423-35.
- 29 Scholl UI, Choi M, Liu T, Ramaekers VT, Häusler MG, Grimmer J, Tobe SW, Farhi A, Nelson-Williams C, Lifton RP. Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 7;106(14):5842-7.
- 30 Bockenhauer D, Feather S, Stanescu HC, Bandulik S, Zdebik AA, Reichold M, Tobin J, Lieberer E, Sterner C, Landouere G, Arora R, Sirimanna T, Thompson D, Cross JH, van't Hoff W, Al Masri O, Tullus K, Yeung S, Anikster Y, Klootwijk E, Hubank M, Dillon MJ, Heitzmann D, Arcos-Burgos M, Knepper MA, Dobbie A, Gahl WA, Warth R, Sheridan E, Kleta R. Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N Engl J Med*. 2009 May 7;360(19):1960-70.
- 31 Miller RT. Genetic disorders of NaCl transpor in the distal convoluted tubule. *Nephron Physiol* 2011 Nov 11;118:15-21.
- 32 Sala-Rabanal M, Kucheryavykh LY, Skatchkov SN, Eaton MJ and Nichols CG. Molecular mechanisms of EAST/SeSAME syndrom mutations in Kir4.1 (KCNJ 10). *J. Biol. Chem*. 2010 Aug 31, 285:36040-36048.
- 33 Williams DM¹, Lopes CM, Rosenhouse-Dantsker A, Connelly HL, Matavel A, O-Uchi J, McBeath E, Gray DA. Molecular basis of decreased Kir4.1 function in SeSAME/EAST syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Dec;21(12):2117-29.
- 34 Zaika OL, Mamenko M, Palygin O, Boukelmoune N, Staruschenko A, Pochynyuk O. Direct inhibition of basolateral Kir4.1/5.1 and Kir4.1 channels in the cortical collecting duct by dopamine. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Nov 1;305(9):F1277-87.
- 35 Swale DR, Kharade SV, Denton JS. Cardiac and renal inward rectifier potassium channel pharmacology: emerging tools for integrative physiology and therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2014 Apr;15:7-15.

- 36 Sgard F, Faure C, Drieu la Rochelle C, Graham D, O'Connor SE, Janiak P, Besnard F. Regulation of ATP-sensitive potassium channel mRNA expression in rat kidney following ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:618-22.
- 37 Bayliss DA, Sirois JE, Talley EM. The TASK family: two-pore domain background K⁺ channels. *Mol Interv* 2003;3:205-219.
- 38 Chatelain FC¹, Bichet D, Feliciangeli S, Larroque MM, Braud VM, Douguet D, Lesage F. Silencing of the tandem pore domain halothane-inhibited K⁺ channel 2 (THIK2) relies on combined intracellular retention and low intrinsic activity at the plasma membrane. *J Biol Chem*. 2013 Dec 6;288(49):35081-92.
- 39 De La Rosa D, Li H, Canessa CM: Effect of aldosterone on biosynthesis, traffic, and functional expression of epithelial sodium channels in A6 cells. *J Gen Physiol* 2002;119:427-442.
- 40 Huang CL. Regulation of ROMK trafficking and channel activity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:693-698.
- 41 Klussmann E, Maric K, Rosenthal W: The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2000;141:33-95.
- 42 Snyder PM. Minireview: Regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking. *Endo* 2005;146:5079-5085.
- 43 Ward DT, Hammond TG, Harris HW. Modulation of vasopressin-elicited water transport by trafficking of aquaporin2-containing vesicles. *Annu Rev Physiol* 1999;61:683-697.
- 44 Jung JS¹, Lee RH, Koh SH, Kim YK. Changes in expression of sodium cotransporters and aquaporin-2 during ischemia-reperfusion injury in rabbit kidney. *Ren Fail*. 2000;22(4):407-21.
- 45 Kang D¹, Hogan JO, Kim D. THIK-1 (K2P13.1) is a small-conductance background K(+) channel in rat trigeminal ganglion neurons. *Pflugers Arch*. 2014 Jul;466(7):1289-300.
- 46 Persson AE, Salomonsson M, Westerlund P, Greger R, Schlatter E, Gonzalez E. Macula densa cell function. *Kidney Int* 1991;32:S39-S44.

47 Hurst AM, Lapointe J-Y, Laamarti A, Bell PD. Basic properties and potential regulators of the apical K⁺ channel in macula densa cells. *J Gen Physiol* 1994;103:1055-1070.

48 Feliciangeli S¹, Tardy MP, Sandoz G, Chatelain FC, Warth R, Barhanin J, Bendahhou S, Lesage F. Potassium channel silencing by constitutive endocytosis and intracellular sequestration. *J Biol Chem*. 2010 Feb 12;285(7):4798-805.

49 Talley EM¹, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA. CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci*. 2001 Oct 1;21(19):7491-505.

KARGER PUBLISHERS LICENSE

TERMS AND CONDITIONS

Oct 09, 2016

This Agreement between Irena Goranova ("You") and Karger Publishers ("Karger Publishers") consists of your license details and the terms and conditions provided by Karger Publishers and Copyright Clearance Center.

License Number	3932571026857
License date	Aug 19, 2016
Licensed Content Publisher	Karger Publishers
Licensed Content Publication	Cellular Physiology and Biochemistry
Licensed Content Title	Cellular Localization of THIK-1 (K2P13.1) and THIK-2 (K2P12.1) K ⁺ Channels in the Mammalian Kidney
Licensed copyright line	Copyright © 2008, Karger Publishers
Licensed Content Author	Theilig Franziska, Goranova Irena, Hirsch Jochen R., et al
Licensed Content Date	Jan 16, 2008
Licensed Content Volume Number	21
Licensed Content Issue Number	1-3
Special issue or supplement	
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	author of requested content
Format	Print, Electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	5
Include Image file	yes
Figure/table/illustration description	Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7
Rights for	Main product

Duration of use	Life of current edition/presentation
Creation of copies for the disabled	no
With minor editing privileges	no
For distribution to	Europe
In the following language(s)	Original language plus one translation
Specific languages	German
The lifetime unit quantity of new product	1
The requesting person/organization is:	Irena Goranova
Order reference number	
Title of your thesis / dissertation	Lokalisation von Kir4.1, THIK-1 und THIK-2 in der Ratten- und Mausniere
Expected completion date	Oct 2016
Estimated size (pages)	50
Requestor Location	Irena Goranova
Publisher Tax ID	980406204

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Irena Goranova, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Die segmentspezifische Lokalisation von Kir4.1, THIK-1 und THIK-2 Kaliumkanäle in der Säugerniere“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Irena Goranova hatte folgenden Anteil an die folgende Publikation:

Theilig F, Goranova I, Hirsch JR, Wieske M, Ünsal S, Bachmann S, Veh RW and Derst C:
Cellular Localization of THIK-1 (K2P13.1) and THIK-2 (K2P12.1) K⁺ Channels in the
Mammalian Kidney. Cell Physiol Biochem 2008;21:63-74.

- Durchführung der Laborexperimente

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Publikationsliste

Theilig F, Goranova I, Hirsch JR, Wieske M, Ünsal S, Bachmann S, Veh RW and Derst C: Cellular Localization of THIK-1 (K2P13.1) and THIK-2 (K2P12.1) K⁺ Channels in the Mammalian Kidney. *Cell Physiol Biochem* 2008;21:63-74.

Friedersdorff F, Aghdassi SJ, Werthemann P, Cash H, Goranova I, Busch JF, Ebbing J, Hinz S, Miller K, Neymeyer J, Fuller TF: Laparoendoscopic single-site (LESS) varicocelectomy with reusable components: comparison with the conventional laparoscopic technique. *Surg Endosc.* 2013 Oct;27(10):3646-52. doi: 10.1007/s00464-013-2938-z. Epub 2013 Apr 3. Erratum in: *Surg Endosc.* 2013 Oct;27(10):3653.

Busch J, Seidel C, Goranova I, Erber B, Peters R, Friedersdorff F, Magheli A, Miller K, Grünwald V, Weikert S: Categories of response to first line vascular endothelial growth factor receptor targeted therapy and overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2014 Feb;50(3):563-9. doi: 10.1016/j.ejca.2013.10.017. Epub 2013 Nov 13.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Mutter Karolina und meiner Schwester Desislava für die moralische Unterstützung all die Jahre bedanken. Ebenso danke ich Alexander Paliege und Jonas Busch für die mehrmalige Durchsicht meiner Doktorarbeit.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Sebastian Bachmann für die wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation.