



Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Rolf F. Maier

Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. S. Waldegger

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

---

# **Interaktion des ROMK-Kaliumkanals mit dem ABCB1- (ATP-Binding Cassette Typ B1) Protein**

## **Inauguraldissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Phillipps-Universität

vorgelegt von

**Johannes Hilpert**

aus Eckernförde

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
15.11.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. S. Waldegger

1. Koreferent: PD Dr. med. R. Preisig-Müller

**ABSTRACT****Physiological interaction of ROMK with the ABCB1-protein  
(ABC-transporter B1)**

Hereditary salt-losing tubular disorders are rare but life-threatening genetic diseases. Early diagnosis and therapeutic intervention prevent patients fatal outcome. Prenatal diagnosis may reveal up to 60% of underlying genetic defects. 40% of the genetic defects, however, still remain unknown. While searching for new candidate genes, we identified ABCB1 in Yeast-Two-Hybrid studies as a ROMK interacting protein. The Renal Outer Medullary Potassium Channel (ROMK) is crucial for the process of salt absorption in the thick ascending limb of Henle's loop (TAL). A functional defective ROMK channel results in severe, prenatal onset renal salt wasting accompanied by maternal polyhydramnios, prematurity, and hypovolemia showing the phenotype of the antenatal Bartter-Syndrome. Therefore ROMK-interacting partners may be promising candidates, which could be responsible for genetically unexplained salt wasting tubular disorders.

In this study the physiological interaction of ROMK and ABCB1 is characterised in *Xenopus laevis* oocytes as a heterologous expression system by using the Two-Electrode-Voltage-Clamp method (TEVC-method) and a luminometric assay for surface quantification studies.

Results revealed a strong effect of ABCB1 on ROMK mediated whole-cell currents when coexpressed in *Xenopus* Oocytes. ABCB1 causes a massive inhibition (up to 100%) of the ROMK-dependent whole cell current as measured by the TEVC. The inhibition depends upon injected ABCB1 m-RNA concentrations. ABCB1 co-expression did not inhibit currents mediated by Kir2.1, an inward rectifier potassium channel closely related to ROMK. Moreover, a different renal protein called Barttin did not cause any effect on ROMK, when injected in ABCB1 equivalent quantities. These findings indicate the interaction to be specific for ROMK and ABCB1.

To specify the effect caused by the ABCB protein, surface-quantification-studies with a heamagglutinin tagged ROMK-Protein (ROMK-HA) were carried out. The HA-tag was introduced into the extracellular domain of the ROMK-Protein, which enabled specific binding of antibodies to membrane inserted ROMK exclusively.

The studies showed a 60% reduction of surface signal, when ROMK-HA was coinjected with ABCB1 compared to ROMK-injection alone. Since Western Blots showed that surface signal reduction was not due to ROMK degradation, we conclude that ABCB1 interferes with ROMK trafficking towards the cell membrane. However, an additional effect of ABCB1 on ROMK channel gating can not be excluded.

Other ABC-transporter proteins have been shown to interact with ATP-dependent K<sup>+</sup> inward-rectifier (Kir) channels. One well known example is the interaction of Kir6.2 with the sulfonyl urea receptor (SUR) in the pancreatic  $\beta$ -cell. Both, channel and ABC-molecule, form an heterooctamer which is the molecular basis of the ATP-sensitive  $\beta$ -cell potassium conductance.

Coexistence of at least two distinct apical K<sup>+</sup> channels in the TAL, a 35 pS (low-conductance) channel and a 70 pS (intermediate-conductance) channel, has been shown. Functional characterisation of isolated expressed ROMK was compatible with the native 35 pS K<sup>+</sup> channel. Whereas isolating the 70 pS K<sup>+</sup> channel failed in the past. In addition to that ROMK-deficient mice neither express the 35 pS K<sup>+</sup>-channel nor the 70 pS K<sup>+</sup>-channel. These findings strongly suggest the 70 pS K<sup>+</sup>-channel to be composed out of ROMK and an accessory protein which may serve as a  $\beta$ -subunit. Our studies indicate a possible interaction between ROMK and ABCB. If the partners do or do not heteromerise to build a functional channel e.g. similar to the Kir6.2 and SUR interaction, remains unclear. Despite the attenuating effect of ABCB1 on ROMK generated whole cell currents it still might be possible that some functional heteromeric channels reach the plasma membrane. Additionally certain limitations should be considered when using *Xenopus* Oocytes, such as low incubation temperature or possible interaction between endogenously and heterologously expressed proteins. Regarding this, a possible influence of ABCB1 on renal salt-and water reabsorption requires further investigation. This includes studies in human cell lines or e.g. knockout mice studies.

Although these observations were made independently and not in direct comparison, it should be noted that there is a phenotypical concordance between ROMK and ABCB1 knock out mice concerning several features of renal concentration capabilities and salt wasting. Both types of knockout mice show increased diuresis, lower renal plasma flow combined with lower glomerular filtration rate, as well as an augmented urinary excretion of sodium and calcium along with poor concentration capabilities.

---

If ABCB1 should be proven to function as a distinct modulating element in renal salt- and water reabsorption, genomic DNA samples of patients could be screened to define genetically unexplained salt wasting tubular disorders. Beyond that our findings may possibly contribute to the understanding of the overall process of renal salt absorption.

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Mechanismen der Salzresorption entlang des Nephrons.....	1
1.2	Mechanismen der Salzresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL) und dem distalen Konvolut (DCT) .....	2
1.3	Salzverlustkrankungen der Niere .....	3
1.3.1	<i>Das antenatale Bartter-Syndrom</i> .....	4
1.3.2	<i>Das antenatale Bartter-Syndrom mit Innenohrtaubheit (aBS/HPS with sensorineural deafness)</i> .....	6
1.3.3	<i>Das klassische Bartter Syndrom (cBS)</i> .....	7
1.3.4	<i>Das Gitelman-Syndrom (GS)</i> .....	7
1.4	Der Renal Outer Medullary K <sup>+</sup> -Kanal (ROMK) .....	8
1.4.1	<i>Struktur des ROMK-Kanals</i> .....	8
1.4.2	<i>Genlokus, ROMK-Isoformen und deren Lokalisation</i> .....	9
1.4.3	<i>Eigenschaften und Regulationsmechanismen</i> .....	10
1.4.4	<i>ROMK Knockout-Maus Modell</i> .....	12
1.5	Das ABCB1-Protein (ATP-Binding-Cassette Typ B1).....	13
1.5.1	<i>Struktur und Membrantopologie von ABCB1</i> .....	13
1.5.2	<i>Genlokus und Expressionsorte des humanen MDR1/ABCB1-Gens</i> .....	14
1.5.3	<i>Physiologische Funktionen des ABCB1-Transporters</i> .....	15
1.6	Hintergrund und Fragestellung der vorliegenden Arbeit .....	16
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>18</b>
2.1	Chemikalien.....	18
2.2	Instrumente und Hilfsmittel.....	18
2.3	Lösungen.....	22
2.3.1	<i>Lösungen für Oozyten-Messung und -Aufbereitung</i> .....	22
2.3.2	<i>Lösungen und Puffer für Western-Blot</i> .....	22
2.4	Antikörper .....	24
2.5	Oozytenpräparation.....	24
2.5.1	<i>Oozytenisolierung</i> .....	24

---

2.5.2	<i>Oozytenaufbereitung</i> .....	26
2.5.3	<i>Injektion von m-RNA in die Oozyten</i> .....	26
<b>2.6</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.6.1	<i>Molekulares Subklonieren</i> .....	28
2.6.2	<i>m-RNA Synthese und Aufreinigung</i> .....	30
<b>2.7</b>	<b>Elektrophysiologische Methoden</b> .....	<b>32</b>
2.7.1	<i>Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (= Two Electrode Voltage Clamp: TEVC)</i> .....	32
2.7.2	<i>Der Messaufbau</i> .....	33
<b>2.8</b>	<b>Biochemische Methoden</b> .....	<b>35</b>
2.8.1	<i>Oberflächen-Lumineszenzdetektion</i> .....	35
2.8.2	<i>Western Blot</i> .....	36
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>39</b>
3.1	<b>Einführung</b> .....	<b>39</b>
3.2	<b>Linearisierte DNA-Fragmente der erstellten Subklone sowie m-RNA-Produkte der verwendeten Proteine ROMK, ROMK-HA und ABCB</b> .....	<b>40</b>
3.3	<b>Funktionelle Konsequenz der Interaktion von ROMK und ABCB</b> .....	<b>40</b>
3.4	<b>Ergebnis der Koexpression von Barttin und ROMK</b> .....	<b>42</b>
3.5	<b>Effekt verschiedener Konzentrationen des ABCB-Moleküls auf die ROMK-Kanal-Aktivität</b> .....	<b>43</b>
3.6	<b>Spezifität des Effektes von ABCB auf ROMK</b> .....	<b>44</b>
3.7	<b>Effekt von ABCB auf Hämagglutinin-markierte ROMK-Kanäle</b> .....	<b>45</b>
3.8	<b>Effekt des ABCB-Proteins auf die Oberflächenexpression von ROMK</b> .....	<b>46</b>
3.9	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>49</b>
4.1	<b>Methodendiskussion</b> .....	<b>49</b>
4.1.1	<i>Xenopus laevis Oozyten als heterologes Expressionssystem</i> .....	49
4.1.2	<i>pSGEM Subklone und m-RNA Synthese</i> .....	52
4.1.3	<i>Die TEVC-Methode</i> .....	53
4.1.4	<i>Oberflächen-Lumineszenzdetektion und Western Blot</i> .....	55



---

<b>4.2</b>	<b>Ergebnisdiskussion .....</b>	<b>57</b>
4.2.1	<i>Physiologische Interaktion von ROMK-Kanalprotein mit dem ABCB1-Molekül im heterologen Expressionssystem .....</i>	<i>57</i>
4.2.2	<i>Effekt des ABCB-Proteins auf die Membrandichte von ROMK in der Oberflächen-Lumineszenzdetektion .....</i>	<i>59</i>
<b>4.3</b>	<b>Mögliche Konsequenzen aus der gezeigten Interaktion von ROMK und ABCB1.....</b>	<b>60</b>
4.3.1	<i>ROMK-ABCB-Interaktion im physiologischen Kontext.....</i>	<i>60</i>
4.3.2	<i>Schlussfolgerungen.....</i>	<i>63</i>
<b>4.4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>VERWENDETE ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>77</b>
8.1	<i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>77</i>
8.2	<i>Tabellenverzeichnis .....</i>	<i>77</i>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>78</b>
9.1	<i>Verzeichnis akademischer Lehrer.....</i>	<i>78</i>
9.2	<i>Danksagung .....</i>	<i>79</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Mechanismen der Salzresorption entlang des Nephrons

In den menschlichen Nieren werden von der Gesamtheit aller Glomeruli in der Minute ca. 120ml Ultrafiltrat gebildet (Silbernagl S 2003). Eine massive Rückresorption eines Großteils dieses Filtrats aus Wasser und gelösten niedermolekularen Stoffen entlang des Nephrons ist für den Organismus zur Aufrechterhaltung einer ausgeglichenen Wasser- und Elektrolyt-Bilanz unabdingbar. Neben der Reabsorption von Glukose, Aminosäuren, Harnsäure, Oxalat, Oligopeptiden, kleinemolekularen Proteinen u.v.a. ist die Resorption und Sekretion von Salzen eine zentrale Aufgabe. Die Segmente des Nephrons tragen dazu in unterschiedlichen Anteilen bei. Die für die Resorption verantwortlichen Tubulusepithelzellen bedienen sich jeweils verschiedener Transportmechanismen. Der Motor für die meisten dieser Transportprozesse ist die basolateral lokalisierte Natrium-Kalium-ATPase ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ). Ein weiterer Mechanismus ist der sogenannte „Solvent Drag“. Die gelösten Teilchen werden hier durch das aus osmotischen Gründen dem Stofftransport folgenden Wasser „mitgerissen“ (Silbernagl S 2003). Natrium wird in sämtlichen Tubulusabschnitten resorbiert. Es entfallen ca. 65% der Reabsorption auf den proximalen Tubulus. Die Resorption von Chlorid-Ionen findet zu 50% im proximalen Tubulus statt. Sie erfolgt hier hauptsächlich parazellulär. Kalium wird proximal ebenfalls zu 65% resorbiert. Allerdings findet der Kalium-Transport im Vergleich zum Natrium-Transport größtenteils passiv und parazellulär statt. Solvent Drag und das spätproximale lumenpositive transepitheliale Potenzial sind hier die Triebkräfte.

Weitere 25% des filtrierte Natriums werden im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL: Thick Ascending Limb) sekundär-aktiv zusammen mit Kalium (15%) und Chlorid (>25%) aufgenommen. Hier ist der  $\text{Na}^+ - 2\text{Cl}^- - \text{K}^+$  Cotransporter (NKCC2) maßgeblich für deren Reabsorption verantwortlich (Jeck et al. 2005) Im distalen Konvolut des Nephrons steht für die Natrium- und Chloridaufnahme der Thiazid-sensitive  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Symportcarrier (NCCT) zur Verfügung. In diesem Abschnitt des Nephrons werden noch einmal ca. 5% des filtrierte Natriums und Chlorids resorbiert.

Im Verbindungstubulus und Sammelrohr wird Natrium über Aldosteron- und ADH-aktivierbare Kanäle (ENaC) in die Hauptzellen aufgenommen. In diesem Abschnitt

kann Kalium wahlweise sezerniert oder resorbiert werden. Bei z.B. erhöhtem Serum-Kalium-Spiegel entweichen die  $K^+$ -Ionen über ROMK-Kanäle (Renal Outer Medullary Potassium Channels) in der luminalen Zellmembran und werden ausgeschieden. Auch hier liefert die basale  $Na^+/K^+$ -ATPase die nötige Energie für die aktiven und passiven apikalen Transportprozesse (Jeck et al. 2005).

## **1.2 Mechanismen der Salzresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (TAL) und dem distalen Konvolut (DCT)**

Im Kontrast zur Resorption im proximalen Tubulus oder im Sammelrohr ist die transzelluläre  $Na^+$ -Aufnahme in der TAL und im DCT direkt an die  $Cl^-$ -Reabsorption gekoppelt. In der TAL wird die Aufnahme durch den Furosemid-sensitiven  $Na^+-K^+-2Cl^-$ -Cotransporter (NKCC2) vermittelt. Die Funktion des in der apikalen Membran lokalisierten Co-Transporters ist eng an zwei weitere Transportvorgänge geknüpft. Die basolateral lokalisierte  $Na^+/K^+$ -ATPase liefert den steilen elektrochemischen Gradienten, der für den gekoppelten Transport von  $Na^+$  mit  $2Cl^-$  und  $1 K^+$  notwendig ist. Ein Teil des aufgenommenen Kaliums wird zur Unterhaltung der Funktion des NKCC2 über den ROMK-Kalium-Kanal rezirkuliert und wieder dem Lumen zugeführt (Landau 2004). Diese Rezirkulation ist für den Transportzyklus des NKCC2 unerlässlich. Chlorid-Ionen verlassen die Zelle basolateral, passiv über zwei weitgehend homologe Chlorid-Kanäle ( $ClC-Ka$  und  $ClC-Kb$ )(Jeck et al. 2005). Die Funktion dieser Kanäle ist wiederum von einem zusätzlichen Protein abhängig, der  $\beta$ -Untereinheit Barttin (Estevez et al. 2001).

Die Zellen der Macula Densa (MD) besitzen die gleiche Ausstattung an Transportern wie die Epithelzellen in der TAL. Der NKCC2 vermittelt unter anderem den Eintritt von Chlorid in die Zelle und ist damit entscheidend an dem Sensormechanismus der MD beteiligt, welcher die Chloridkonzentration der hier ankommenden Flüssigkeit im Tubulus misst. Bei geringer Chloridkonzentration oder einem Ausfall des NKCC2 wird eine Reninausschüttung im juxtaglomerulären Apparat ausgelöst und damit eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) angestoßen. Gleichzeitig kommt es über das sogenannte tubulo-glomeruläre Feedback (TGF) in diesem Fall zu einer Weitstellung des Vas afferens, wodurch sich die glomeruläre Filtrationsrate entsprechend erhöht (Jeck et al. 2005).

Im distalen Konvolut (DCT: Distal Convolutet Tubule) befindet sich luminal der Thiazid-sensitive  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter (NCCT) und transportiert  $\text{Cl}^-$ -Ionen gegen ihren elektrochemischen Gradienten sekundär aktiv in die Tubuluszelle.  $\text{Cl}^-$ -Ionen verlassen die Zelle hier ebenfalls über den basolateral lokalisierten  $\text{Cl}^-$ -Kb-Kanal. Da die Transportmechanismen für Ionen in der TAL wie im DCT sehr eng miteinander verknüpft sind, führt jede „Loss of Function“-Mutation in einem der beteiligten Proteine zu einem kompletten Zusammenbruch des Transportprozesses in dem jeweiligen Tubulussegment (Jeck et al. 2005).

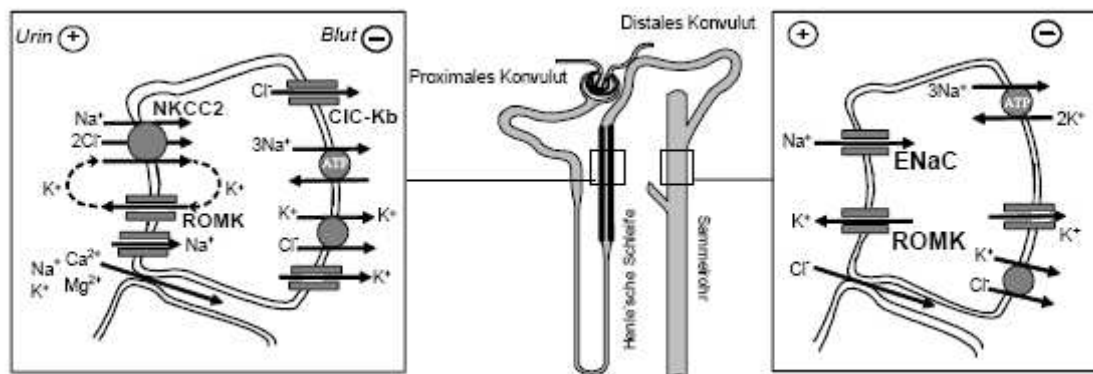


Abbildung 1: Ionenkanäle und Transporter in verschiedenen Nephronabschnitten

### 1.3 Salzverlusterkrankungen der Niere

Salzverlusterkrankungen sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen der Niere, bei denen Transport-Proteine, welche in dem Prozess der tubulären Salzreabsorption beteiligt sind, durch Funktionsausfall zu einer unterschiedlich ausgeprägten Form von Salz- und Wasserverlust führen. Zu dieser Gruppe zählen das antenatale Bartter Syndrom/Hyperprostaglandin-E-Syndrom (aBS/HPS), das aBS/HPS mit zusätzlicher Innenohr-Taubheit (aBS/HPS with sensorineural deafness), das klassische Bartter-Syndrom (cBS) und das Gitelman-Syndrom (GS) (Hebert 2003). Fortschritte in der molekularen Medizin machten es möglich, Patienten anhand ihres Genotyps zu definieren und ihre Erkrankung auf molekularer Ebene nachzuvollziehen. Andersherum halfen Untersuchungen an genetisch definierten Patienten, die Funktion eines einzelnen Proteins in dem integrativen Prozess der tubulären Salzurückgewinnung zu bestimmen (Jeck et al. 2005).

Gen/ Chromosom	Protein/ Transporter	Syndrom	Lokalisation
SLC12A1 15q15-21	NKCC2	aBS/HPS	TAL
KCNJ1 11q24-25	ROMK	aBS/HPS	TAL/ CCD (cortical collecting duct)
CLCNKA + B beide 1p36	CLCKa + b	aBS/HPS + SND	tAL + TAL DCT
BSND 1p31	Barttin	aBS/HPS + SND	tAL + TAL DCT
CLCKB 1p36	CLCKb	BS	DCT TAL
SLC12A3 16q13	NCCT	GS	DCT

**Tabelle 1: Gene und Genprodukte, die an der Entstehung von Salzverlust-Tubulopathien beteiligt sind und ihre Lokalisation entlang des Nephrons**

### ***1.3.1 Das antenatale Bartter-Syndrom***

Patienten mit einer inaktivierenden Mutation im NKCC2 zeigen eine schwere Erkrankung mit pränatalem Beginn. Fetale Polyurie führt schon im 2. Trimenon zu einem zunehmenden Polyhydramnion. Unbehandelt kommt es etwa um die 32 Schwangerschaftswoche zur Frühgeburt. Die Neugeborenen fallen in erster Linie durch eine schwere Polyurie auf und können ohne Flüssigkeitssubstitution innerhalb von 24 h leicht die Hälfte ihres Körpergewichtes an Urin verlieren. Zusätzlich zur iso- oder hypostenurischen Polyurie verlieren die Neugeborenen große Mengen an  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  über den Urin. Innerhalb von wenigen Tagen bis Wochen kommt es zu einem Abfall der Natriumkonzentration und einem Anstieg von Kalium im Urin (sogenannter „ $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -switch“) (Reinalter et al. 1998). Eine erhöhte  $\text{Na}^+$ -Konzentration im distalen Tubulus, insbesondere bei gleichzeitiger Aktivierung des RAAS steigert die renale  $\text{K}^+$ - und  $\text{H}^+$ -Ausscheidung und bewirkt eine hypokaliämische Alkalose (Jeck et al. 2005).

Die Zellen der MD vermitteln im Bezug auf die tubuläre Chlorid-Konzentration ein falsches Signal. Trotz einer tubulär hohen Konzentration zeigen die MD-Zellen geringe Chlorid-Konzentrationen im Tubuluslumen an und aktivieren über MAP-Kinasen und

Cyclooxygenasen (COX-2) die Renin-Freisetzung in den juxtaglomerulären Zellen (Reinalter et al. 2002). Dieser Mechanismus ist unter anderen ein Grund für die exzessiv gesteigerte Prostaglandin  $E_2$  -Synthese und Ausscheidung bei den betroffenen Patienten. Seyberth machte schon 1987 darauf aufmerksam, dass den erhöhten  $PGE_2$ -Spiegeln eine Schlüsselfunktion zukommt und führte aufgrund dessen den Begriff des Hyperprostaglandin E- Syndroms ein (Seyberth et al. 1987).

In den ersten Lebensmonaten entwickeln nahezu alle Patienten mit aBS/HPS eine medulläre Nephrokalzinose, einhergehend mit erhöhter  $Ca^{2+}$ -Sekretion über den Urin. Weitere Folgen dieses genetischen Defektes im NKCC2-Transportprotein sind neben der oben genannten massiven Polyurie und den lebensbedrohlichen Elektrolyt- und Flüssigkeitsverlusten eine Dystrophie des Kindes, Osteopenie, Krämpfe und Episoden von Fieber, Erbrechen und Diarrhoe (Seyberth 1994). Durch eventuell auftretende Hypokaliämien kann es zudem zu einer Störung der Erregungsleitung des Herzens und nachfolgenden Herzrhythmusstörungen kommen (Jeck et al. 2005).

Die Funktion des NKCC2-Transporters erfordert ein kontinuierliches  $K^+$ -Angebot vom Tubuluslumen. Um dies zu gewährleisten, besitzen die Zellen der TAL und der MD den apikal lokalisierten  $K^+$ -Kanal ROMK, der ein  $K^+$ -Recycling ermöglicht. Durch die enge funktionelle Kopplung der beiden Einheiten haben Patienten mit einer Loss-of-Function-Mutation im ROMK-Kanal eine fast identische Symptomatik wie Patienten mit einem Defekt im NKCC2. Allerdings zeigen diese Patienten in den ersten Lebensstagen eine transiente Hyperkaliämie. Diese Tatsache wird der zusätzlichen Rolle des ROMK-Kanals im Kortikalen Sammelrohr (CCD: Cortical Collecting Duct) zugeschrieben. ROMK ist hier an der  $K^+$ -Sekretion beteiligt (Jeck et al. 2001).

Da es bisher keine Möglichkeit gibt, das aBS/HPS kurativ zu behandeln, beschränkt sich die Therapie der Erkrankung auf die Symptombekämpfung. Dazu ist v.a. in der Neonatalperiode die Substitution von Flüssigkeit und Elektrolyten in Kombination mit sorgfältigem Monitoring der Flüssigkeitsbilanz von Bedeutung. Kommt es zu der Entwicklung einer hypokaliämischen Alkalose, muss eine Kaliumsubstitution erfolgen. Die Allgemeinsymptome wie Fieber, Erbrechen, Diarrhoe sowie Entwicklungsverzögerung werden der erhöhten Prostaglandin-E-Synthese zugeschrieben und werden gewöhnlich mit Cyclooxygenaseinhibitoren wie z. B. Indomethacin behandelt (Peters et al. 2003b).

### ***1.3.2 Das antenatale Bartter-Syndrom mit Innenohrtaubheit (aBS/HPS with sensorineural deafness)***

Eine besondere Variante des aBS/HPS ist das aBS mit sensorineuraler Taubheit. Patienten mit dieser Erkrankung zeigen einen kombinierten Defekt der Salzresorption sowohl in der TAL als auch im DCT, mit einer dadurch ausgelösten besonders schweren Symptomatik. Dem liegt eine Funktionsstörung der basal in der TAL und im DCT lokalisierten  $\text{Cl}^-$ - Kanalproteine CIC-Ka und CIC-Kb zugrunde. Auslöser ist meist eine inaktivierende Mutation in der für beide Kanäle essentiellen Untereinheit Barttin (Estevez et al. 2001; Birkenhager et al. 2001). Der Phänotyp dieser Patienten ist in vielen Merkmalen nicht von dem klinischen Bild eines Patienten mit Defekt in den Transportmolekülen der apikalen Membran zu unterscheiden.

Fetale Polyurie, maternales Polyhydramnion und Frühgeburtlichkeit sind ebenfalls die ersten Symptome. Nach der Geburt kommt es zu Desmopressin-insensitiver Polyurie als Hauptsymptom. Im Gegensatz zu Patienten mit NKCC2- oder ROMK-Mutation ist eine auftretende Hyperkalziurie aber nur transitorisch und mündet auch nicht in eine Nephrokalzinose. Dafür kommt es zu einer verstärkten Glomerulosklerose und tubulärer Atrophie, mononukleärer Zellinfiltration und damit zu einem progressiven Nierenversagen (Jeck et al. 2001). Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer klinisch relevanten Hypomagnesiämie ist durch den Zusammenbruch der Transportsysteme sowohl in der TAL als auch im DCT erhöht. Außerdem ist der Barttin-Defekt unweigerlich mit sensorineuraler Taubheit verknüpft, da im Innenohr zur Erstellung der speziellen Endolymphzusammensetzung der CIC-K/Barttin-Komplex eine entscheidende Rolle spielt.

Es ist auch ein Fall eines kombinierten genetischen Defektes in den zwei basalen Chlorid-Kanalisoformen CIC-Ka und CIC-Kb beschrieben. Der Phänotyp dieses Patienten kann nicht von dem Erscheinungsbild der Patienten mit Barttin-Defekt unterschieden werden und zeigt ebenfalls ein aBS/HPS mit sensorineuraler Taubheit (Schlingmann et al. 2004).

Die Therapie der Patienten mit aBS/HPS mit Innenohrtaubheit wird ebenfalls symptomorientiert durchgeführt mit Cyclooxygenase-Hemmern als zentralem Bestandteil.

### ***1.3.3 Das klassische Bartter Syndrom (cBS)***

Das klassische Bartter-Syndrom (cBS) wird durch eine Mutation des Gens *CLCNKB* ausgelöst, welches den Chloridkanal ClC-Kb kodiert (Jeck et al. 2005). Im Gegensatz zum aBS/HPS mit sensorineuraler Taubheit, bei dem beide Chlorid-Kanäle ihre Funktion einbüßen, treten hier initiale Symptome erst im Laufe der frühen Lebensjahre auf. Systemisch wird eine hypokaliämische metabolische Alkalose und ein hyperreninämischer Hyperaldosteronismus beobachtet (Amirlak & Dawson 2000). Die Prostaglandinsynthese ist mäßig erhöht. Die Patienten können mit Wachstumsstörungen, Polyurie, Erbrechen, Dehydration und Adynamie symptomatisch werden. Gedeih- und Wachstumsstörungen können durch eine frühzeitig begonnene Therapie mit Cyclooxygenase-Hemmern abgewendet werden.

### ***1.3.4 Das Gitelman-Syndrom (GS)***

Dem Gitelman-Syndrom (GS) liegt eine Mutation des Gens *SLC12A3* zugrunde. Dieses Gen ist für die Expression des Na<sup>+</sup>-Cl-Kotransporters NCCT im DCT verantwortlich (Mastroianni et al. 1996). Das GS wird meist erst im Kindes- oder frühen Erwachsenenalter diagnostiziert und ist durch einen vergleichsweise milden Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Durch ausgeprägte Magnesiumverluste und damit einhergehender Hypomagnesiämie kommt es bei Patienten mit GS häufig zu Muskelschwäche und Tetanien. Hypokalziurie ist ein weiteres Symptom. Die Prostaglandinsynthese ist nur wenig oder gar nicht erhöht (Rodriguez-Soriano 1998). Aus diesem Grund profitieren GS-Patienten nur wenig von einer Behandlung mit Indomethacin, bei ihnen steht therapeutisch eher die Elektrolytsubstitution im Vordergrund. Bei Auftreten von Hypokaliämie kann diese evtl. mit Aldosteronantagonisten behandelt werden (Peters et al. 2003b).



## 1.4 Der Renal Outer Medullary K<sup>+</sup>-Kanal (ROMK)

Der ATP-sensitive ROMK-Kanal (Renal Outer Medullary K<sup>+</sup>-Kanal, Kir1.1) gehört zur Familie der einwärts-gleichrichtenenden Kalium-Kanäle (Kir) und wird in der TAL, dem distalen Tubulus sowie im kortikalen und äußeren medullären Sammelrohr (CCD/MCD) exprimiert (Lee & Hebert 1995). Er gehört zu den best untersuchten K<sup>+</sup>-Kanälen der Niere bezüglich seiner Struktur, seiner Lokalisation und seiner Funktion (Hebert et al. 2005). Wie alle Kir-Kanäle zeigt ROMK bei Expression in *Xenopus laevis* Oozyten eine Einwärts-Gleichrichtung, die zwar schwach ausgeprägt ist, aber dafür dem 35pS Kanal im Nierentubulus entspricht (Hebert et al. 2005; Jeck et al. 2005). Hier trägt er entscheidend zur Funktion der renalen Salzrückgewinnung bei. Im Sammelrohr der Niere besitzt der ROMK-Kanal eine sekretorische Funktion.

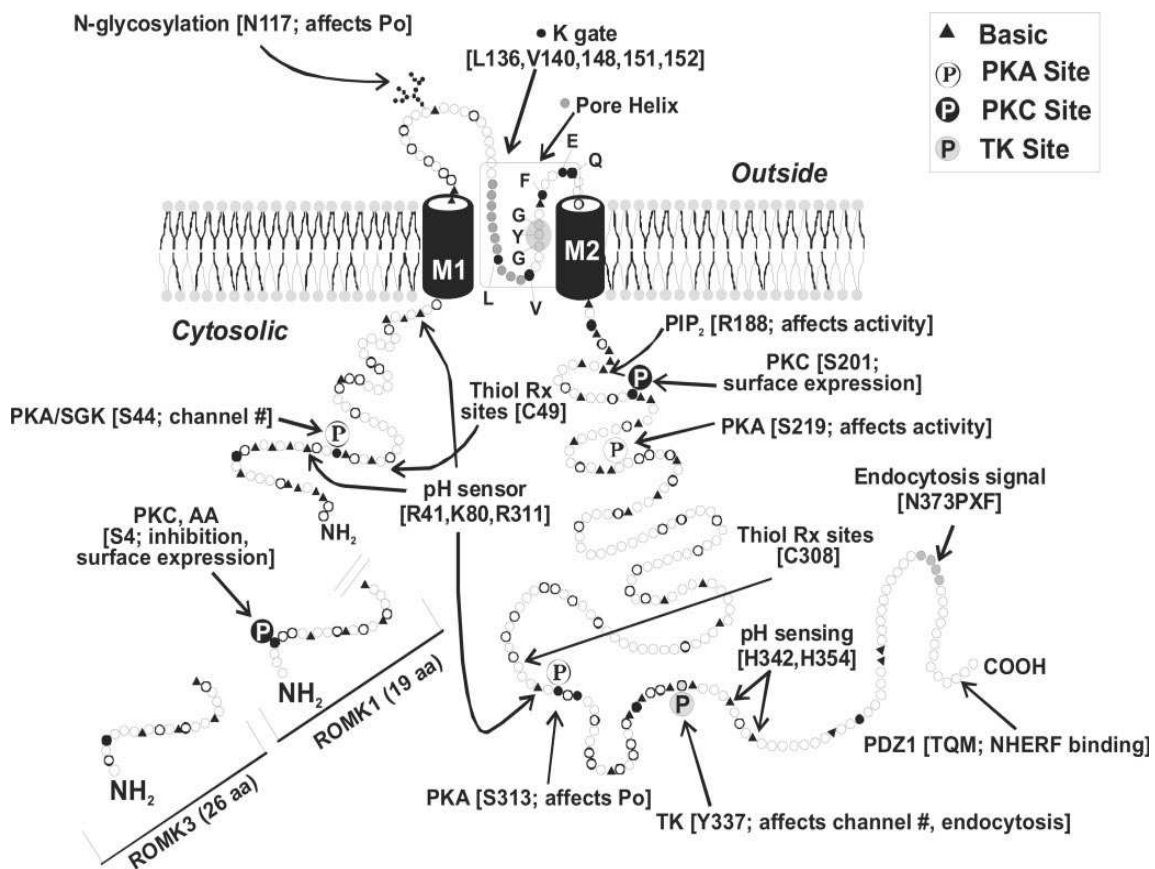
### 1.4.1 Struktur des ROMK-Kanals

Das humane ROMK-Gen *KCNJ1* kodiert für ein 391 Aminosäuren zählendes Protein von 45 kDa mit einer für Kir-Kanäle charakteristischen Membrantopologie (Abbildung 2): Es besteht aus einer N-terminal ca. 80 AS umfassenden, zytoplasmatisch gelegenen Region, zwei hydrophoben  $\alpha$ -helicalen Transmembrandomänen (TM: M1 und M2), einer extrazellulär gelegenen, porenbildenden Region und einem ca. 200 AS umfassenden C-Terminus. Die folgende Modellannahme beruht auf Röntgenstrukturanalysen an dem bakteriellen K<sup>+</sup>-Kanal KirBac1.1, einem nahen Verwandten des ROMK-Kanals: Ein funktionaler ROMK-Kanal besteht demnach aus vier Polypeptid-Untereinheiten, dabei sind die zwei Transmembrandomänen M1 und M2 jeder Untereinheit zu einer symmetrischen tetramerischen Struktur um eine zentrale Kanalpore angeordnet (Hebert et al. 2005). Dieser Tetramer bildet fünf Regionen: 1. Einen äußeren Selektivitätsfilter, welcher das für K<sup>+</sup>-Selektivität verantwortliche Basentriplett Glycin-Tyrosin-Glycin enthält (Jan & Jan 1994). 2. Eine Porenhöhle in der Membran. 3. Ein Kanal-Gate am Membran-Cytosol-Übergang. 4. Flexible Regionen, die die Verbindung zu den  $\beta$ -Faltblattstrukturen der (5.) C-Termini bilden, welche ihrerseits das zytoplasmatische Vestibulum formen (Hebert et al. 2005).

### 1.4.2 Genlokus, ROMK-Isoformen und deren Lokalisation

Das ROMK-Gen *KCNJ1* liegt auf Chromosom 11q24-25 (Krishnan et al. 1995) und enthält mehrere Exons, die durch das unterschiedliche Splicen des Transkripts zu folgenden Isoformen zusammengesetzt werden: ROMK1 (Kir1.1a), ROMK2 (Kir1.1b), ROMK 3 (Kir1.1c) (Boim et al. 1995).

Die ROMK-Isoformen unterscheiden sich durch ihre N-terminale AS-Sequenz: ROMK2 besitzt den kürzesten N-Terminus, ROMK1 und ROMK3 haben eine 19 bzw. 26 AS-Extension (Hebert et al. 2005).



**Abbildung 2: Topologie und funktionelle Domänen von ROMK (1-3)**

ROMK 1 und ROMK 3 unterscheiden sich von ROMK 2 nur in der Länge des N-Terminus. PIP<sub>2</sub>:Phosphoinositolphosphatase; PKA/PKC: Proteinkinase A/C; TK: Tyrosin Kinase; SGK: Serum- und Glucocorticoid-regulierte Kinase (nach Hebert et al. 2005)

ROMK wird in vielen Nephronabschnitten exprimiert, mit Ausnahme des proximalen Tubulus. In der TAL und im DCT findet man hauptsächlich ROMK2 und ROMK3, während die Hauptzellen im CCD vor allem ROMK1 und ROMK2 exprimieren (Boim et al. 1995). Funktionelle Unterschiede zwischen den humanen ROMK-Isoformen sind derzeit nicht bekannt. Extrarenal findet eine ROMK-Expression sowohl im Hirn, als

auch im Uterus während der frühen Schwangerschaft statt. Die Rolle des Kanals in diesen Geweben wurde aber bisher nicht genauer geklärt (Hebert et al. 2005). In dieser Arbeit wurde ausschließlich der humane ROMK2 (hKir1.1b) verwendet. Wenn nicht anders vermerkt wird dieser im Folgenden als „ROMK“ geführt.

### ***1.4.3 Eigenschaften und Regulationsmechanismen***

Im heterologen Expressionssystem zeigen ROMK-Kanäle folgende allgemeine Eigenschaften: Eine schwache Einwärts-Rektifizierung (Ho et al. 1993), Aktivierung durch Phosphorylierung, katalysiert durch die Proteinkinase-A (PKA) (MacGregor et al. 1998), Inhibition durch hohe  $Mg^{2+}$ -ATP-Konzentrationen, wobei die Sensitivität gegenüber ATP zwischen den einzelnen ROMK-Isoformen unterschiedlich stark ausgeprägt ist (McNicholas et al. 1996b), Trafficking-Regulation durch die Protein-Tyrosin-Kinase (PTK) und Phosphatase (Wang et al. 2002) sowie durch die Proteinkinase C (PKC) (Lin et al. 2002), Inhibition durch leichte pH-Reduktion (McNicholas et al. 1998) sowie Arachidonsäure und PKC (Hebert & Wang 1997). Alle ROMK-Isoformen besitzen unter physiologischen Bedingungen eine hohe Offenheitswahrscheinlichkeit ( $P_o > 0,9$ ) (Ho et al. 1993), bei einer pH-Wert Reduktion auf 6,8 ist allerdings nur noch 50% der Öffnungsaktivität messbar, bei pH 6,0 bleiben die Kanäle geschlossen (Schulte et al. 1999). Ein weiterer Kanal-Schließungsmechanismus ist der sogenannte „run down“: Bei einer lang anhaltenden Depolarisation werden die ROMK-Kanäle langsam inaktiviert, trotz konstitutionsbedingt offenem pH-Gate. Dieser spannungsgesteuerte Mechanismus ist von der externen  $K^+$ -Konzentration abhängig (Sackin et al. 2004).

Im C-Terminus des ROMK-Proteins (Position 373-378) befindet sich die sogenannte „Walker A Site“. Diese Sequenz erleichtert die Proteinplatzierung in den für die Endozytose mitverantwortlichen „Clathrin Coated Vesicles“ (Mellman 1996) und scheint auch bei der Endozytose von ROMK-Proteinen eine Rolle zu spielen.

Eine wichtige Eigenschaft ist die ATP-Sensitivität des ROMK-Kanals. Die Bindungsdomäne für ATP liegt ebenfalls im C-Terminus und wird von den 39 AS an den Loci 186 bis 225 gebildet (Dong et al. 2001).  $Mg^{2+}$ -ATP-Konzentrationen im millimolaren Bereich inhibieren den Kanal (McNicholas et al. 1998).

Diese Form der Inaktivierung ist nicht ungewöhnlich für einwärts-gleichrichtende  $K^+$ -Kanäle. Ein weiterer gut untersuchter ATP-sensitiver Kalium-Kanal ist z.B. Kir6.2 in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle (Tucker & Ashcroft 1998). Dieser klassische Vertreter ist ein

Heterooctamer aus vier porenbildenden Kir6.2 und vier regulatorischen Sulfonylharnstoff-Rezeptor-Proteinen (SUR) (Aguilar-Bryan et al. 1998). SUR gehört zur Familie der ATP-Cassette-Binding-Proteine (ABC-Proteine) und ist der Angriffspunkt für Sulfonylharnstoffe wie Glibenclamid, die in der Diabetes mellitus Therapie zum Einsatz kommen. Die funktionelle Kopplung von Kir6.2 mit SUR ist nicht nur von weitreichender physiologischer und klinisch-therapeutischer Bedeutung, sondern auch die am besten untersuchte Interaktion eines ABC-Transporters mit einem ATP-abhängigen Kaliumkanal. Aufgrund der engen Verwandtschaft von ROMK mit Kir6.2 ist die Suche nach einer regulatorischen ROMK-Untereinheit in der Familie der ABC-Proteine Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen. Sowohl SUR1, SUR2B als auch der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) als Mitglieder der ABC-Familie wurden bisher als mögliche ROMK-Interaktionspartner untersucht. Dabei fanden Ruknudin et al 1998 bei einer Coexpression von ROMK und CFTR in *Xenopus* Oozyten, dass der CFTR die Sensitivität von ROMK gegenüber einer Inhibition durch  $Mg^{2+}$ -ATP erheblich erhöht, was auch in späteren Untersuchungen bestätigt wurde (Lu et al. 2006). Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass der CFTR in vivo durch ROMK Regulation eine entscheidende Rolle in der renalen Salz und Wasserresorption einnimmt, zumal bei Patienten mit Cystischer Fibrose ein ausgeprägter renaler Salz- und Wasserverlust nicht zu den typischen Symptomen zählt. Dong et al. beschrieben 2001 eine glibenclamidabhängige Erhöhung von ROMK2 Kanalströmen bei Koexpression mit SUR2B in Rattennierenzellen, die auf eine Interaktion der beiden Proteine hinweisen könnte (Dong et al. 2001). Allerdings wurde dies durch Konstas et al. deutlich in Frage gestellt (Konstas et al. 2002a). Eine in vivo Interaktion von ROMK mit einem der bisher genannten ABC-Proteine kann damit nicht als gesichert gelten.

#### 1.4.4 ROMK Knockout-Maus Modell

Die Deletion des *KCNJ1* Gens in Knock-out-Mäusen führt zu schwerem Salz- und Wasserverlust und bestätigt die Wichtigkeit von ROMK hinsichtlich der Salzreabsorption entlang der TAL und hinsichtlich seiner Funktion in den Hauptzellen des CCD (Lorenz et al. 2002). Die starke Ausprägung des Konzentrationsdefektes mag auf den ersten Blick überraschend erscheinen, da in früher durchgeführten Mikroperfusionsstudien die Existenz von mindestens zwei verschiedenen apikalen Kalium-Kanälen in der TAL demonstriert wurde: Ein Kanal mit niedriger (35pS) und ein Kanal mit mittlerer (70pS) Leitfähigkeit (Bleich et al. 1990). Die funktionelle Charakterisierung des isoliert exprimierten ROMK stimmt mit dem nativen 35pS  $K^+$ - (low conductance) Kanal überein (Jeck et al. 2005). Im Gegensatz dazu war es bisher nicht möglich, den 70pS  $K^+$ -Kanal erfolgreich zu isolieren. Allerdings fanden Lu et al. 2004, dass ROMK für die Expression des 70pS Kanals in der TAL notwendig ist (Lu et al. 2004). Dies bekräftigt die Annahme, dass sich der 70pS Kanal aus dem 35pS Kanal und einer akzessorischen Untereinheit mit modifizierenden Eigenschaften zusammensetzt. Aufgrund der bereits beschriebenen Interaktion zwischen Mitgliedern der ABC-Familie und ATP-sensitiven  $K^+$ -Kanälen der Kir-Familie ist ein ABC-Protein auch hier als mögliche Untereinheit in Betracht zu ziehen.

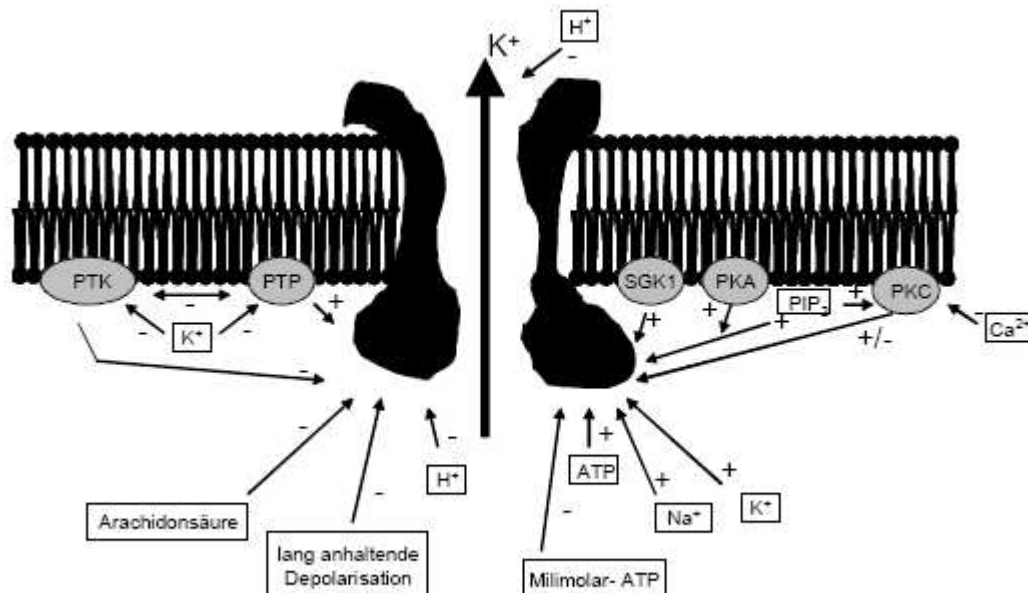


Abbildung 3: ROMK beeinflussende Regulationsfaktoren (Giebisch 1998)

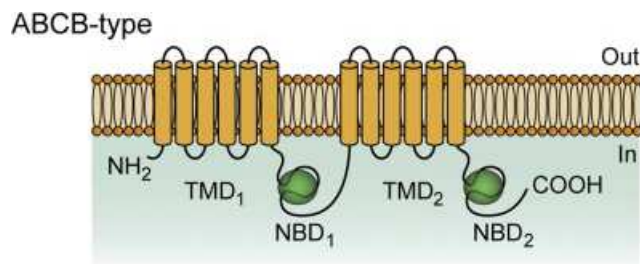
## **1.5 Das ABCB1-Protein (ATP-Binding-Cassette Typ B1)**

Das ABCB1-Protein gehört zur sowohl in Prokaryonten als auch Säugetierzellen weit verbreiteten Gruppe der ATP-Binding-Cassette-Familie und hier wiederum zur großen Untergruppe der Multi-Drug-Resistance-Proteine (MDR). Ihre hauptsächliche Funktion liegt in dem Schutz der Zelle vor hydrophoben, xenobiotischen Substanzen (Sarkadi et al. 2006). Das ABCB1-Molekül fungiert als Pumpe in der Zellmembran und transportiert energieabhängig hauptsächlich große hydrophobe Moleküle aus der Zelle. Es ist das archetypische Modell eines ABC-Transporters, welches zuerst entdeckt und in der Folge umfangreich untersucht wurde. Es wird als das medizinisch bedeutendste ABC-Molekül bezeichnet und besitzt gleichzeitig die breiteste Substratspezifität (Jones & George 2004).

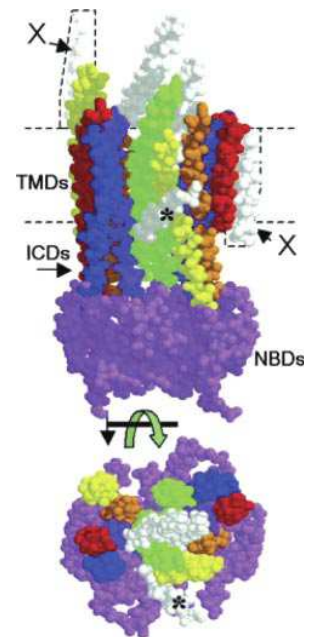
### ***1.5.1 Struktur und Membrantopologie von ABCB1***

Das ABCB1-Molekül ist ein Protein aus 1280 Aminosäuren. Die Primärsequenz zeigt eine zweifache Wiederholung von Transmembrandomänen und ATP-bindenden Kassetten sowie eine Verbindungssequenz, die diese beiden homologen Hälften des Proteins miteinander konnektiert. Die beiden Proteinhälften formen eine pseudo-zweifach-symmetrische Struktur, in der die Membranhelices einen porenähnlichen Trichter bilden, durch den die Substrattranslokation stattfindet. Die beiden Transmembrandomänen des Moleküls bestehen aus jeweils 6 Transmembranhelices (Kast et al. 1996). Sie bilden die trichterförmige hydrophile Kammer in der Membranebene mit Öffnung nach extrazellulär (Rosenberg et al. 2005) Die Nukleotid-Bindungs-Domänen (NBDs) liefern die durch ATP-Bindung und -Hydrolyse freiwerdende Energie für den Translokationsprozess (Sarkadi et al. 2006). Die NBDs liegen intrazellulär dicht beieinander und erlauben so eine ausgedehnte Interaktion der katalytischen Zentren.

A)



B)



**Abbildung 4: Der ATP-Cassette-Binding-Transporter Typ B**

Membrantopologie des ABCB-Typ-Transportermoleküls A); Dreidimensionales Modell des humanen ABCB1-Transporters in der Nukleotid-gebundenen Form B); (NBD: Nukleotid-Bindungs-Domäne, TMD<sub>1+2</sub>: Transmembrandomänen, ICD: Intrazelluläre Domäne, X: Lokalisation dieser Helixstruktur unklar (adaptiert nach Rosenberg et al. 2005)

### ***1.5.2 Genlokus und Expressionsorte des humanen MDR1/ABCB1-Gens***

Das MDR1-Gen liegt auf dem Chromosom 7q21 und enthält 28 Exons (Sarkadi et al. 2006). MDR1 wird in der apikalen Membran polarisierter Epithelzellen folgender Gewebe exprimiert: in den Bürstensaumzellen des Intestinums, in der biliären Membran der Hepatozyten und an den pharmakologischen Barrieren des Körpers wie der Blut-Hoden-, Blut-Hirnschranke und dem Plexus Choroideus (Klein et al. 1999). In der menschlichen Niere wird ABCB1 in den Zellen des Mesangiums, des proximalen Tubulus, der TAL und dem Sammelrohr exprimiert (Ernest & Bello-Reuss 1999). Geringere Level des ABCB1-Proteins wurden in der Plazenta, der Nebennierenrinde und in den CD34<sup>+</sup>-Stammzellen des hämatopoetischen Systems gefunden (Sarkadi et al. 2006).

### ***1.5.3 Physiologische Funktionen des ABCB1-Transporters***

Der Schwerpunkt der medizinischen Forschung bezüglich des ABCB1-Proteins zielt zumeist darauf, die Fähigkeiten und Mechanismen des Transports von xenobiotischen Substanzen durch ABCB1 zu verstehen. Seine Möglichkeiten, eine Vielzahl von toxischen Molekülen vektoriell aus der Zelle zu schleusen, lassen vermuten, dass die physiologische Rolle von ABCB1 in dem Schutz der Zellen und des Organismus vor toxischen Stoffen besteht (Klein et al. 1999). Aufgrund dieser Eigenschaften ist der ABCB1-Transporter insbesondere mitverantwortlich für die Chemoresistenz von Tumorzellen und deshalb medizinisch von besonderem Interesse. Untersucht wurde die physiologische Funktion von MDR1/ABCB1 in einem Knockout-Mausmodell, in dem eines oder beide der MDR1-Allele ausgeschaltet wurden. Die Knockout-Mäuse erschienen äußerlich vital und fertil, ohne ausgeprägte physiologische Abnormalität. Mäuse, bei denen beide Gene ausgeschaltet wurden, reagierten jedoch übersensibel auf xenobiotische Substanzen (Kwei et al. 1999).

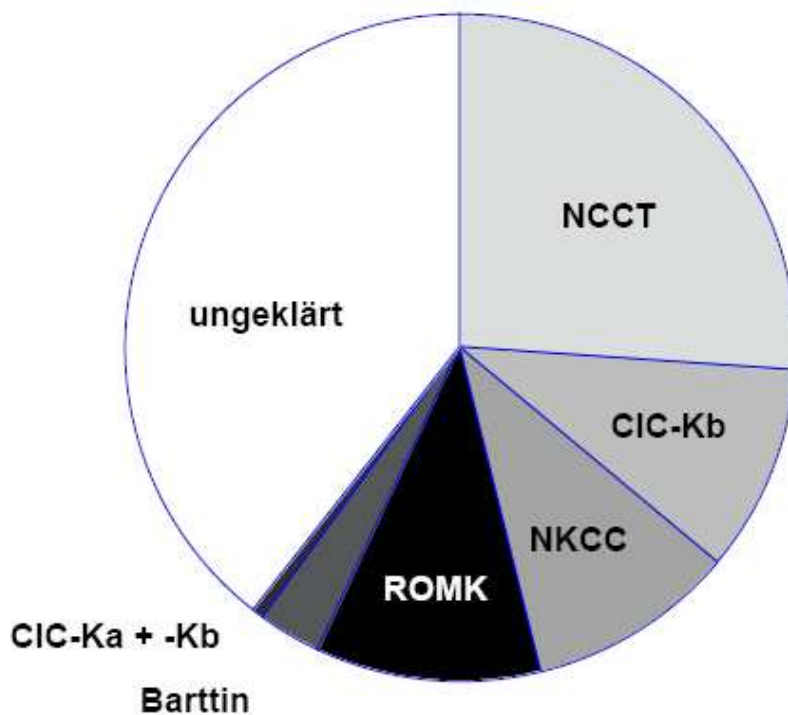
Neueren Untersuchungen zu Folge weisen diese Tiere jedoch im Vergleich zur Wildtyp-Maus deutliche Unterschiede in der renalen Funktion auf. Knockout-Mäuse zeigen eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate und einen verminderten renalen Plasmafluss, vermehrte Glucose, Aminosäuren und niedermolekulare Proteine im Urin sowie eine auffällig erhöhte Natrium- und Kalziumexkretion kombiniert mit einer gesteigerter Diurese (Huls et al. 2007). Es fallen hier also deutliche Übereinstimmungen mit der Symptomatik eines typischen ROMK-Loss-of-Function-Phänotyps auf, bei dem der renale Salz- und Wasserverlust im Vordergrund steht (Lorenz et al. 2002).

Interaktion von ATP-sensitiven Kir-Kanälen mit ABC-Proteinen sind wie oben beschrieben nicht ungewöhnlich. Das Erscheinen eines ROMK-Knockout ähnlichen Phänotyps in ABCB1(-/-) Mäusen verknüpft mit dem Wissen über das Auftreten von Kir<sub>ATP</sub>-Kanal-ABC-Protein Interaktion in vivo führt zu der Annahme, dass ABCB1 ein wichtiges ROMK-interagierendes Protein darstellen könnte, welches den Mechanismus der tubulären Salzresorption mit beeinflusst.



## 1.6 Hintergrund und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Angeborene Salzverlusterkrankungen der Niere sind seltene, jedoch vital bedrohliche genetische Erkrankungen, deren rechtzeitige Diagnose und Therapie das Überleben der betroffenen Kinder sichern. Wünschenswert ist eine frühzeitige Diagnosefindung, idealer Weise bereits vor der Geburt, da therapeutische Maßnahmen unmittelbar postnatal eingeleitet werden müssen. Die bislang verfügbare pränatale Diagnostik hinsichtlich dieser Erkrankungen erkennt bisher leider nur maximal 60% der zugrunde liegenden genetischen Defekte (Abbildung 5). Bei den restlichen 40% bleibt der genetische Defekt unbekannt.



**Abbildung 5: Kandidatengene angeborener Salzverlusterkrankungen**

Patientenkollektiv des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin der Marburger Philipps-Universität (n=504)

Auf der Suche nach neuen Kandidatengenen angeborener Salzverlusterkrankungen identifizierten wir in ersten Experimenten mit Hilfe der Yeast-Two-Hybrid Technologie ABCB1 als ein Protein, das mit dem renalen Kalium Kanal ROMK interagiert. ROMK katalysiert einen wesentlichen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der tubulären Salzresorption in der TAL, daher sind ROMK-interagierende Proteine

vielversprechende Kandidatenproteine bisher genetisch nicht geklärter Salzverlustkrankungen.

In dieser Arbeit wird die Interaktion von ROMK mit ABCB1 im heterologen Expressionssystem von *Xenopus laevis* Oozyten physiologisch charakterisiert.

Dazu werden ROMK-Kanäle und ABCB-Proteine in *Xenopus laevis* Oozyten koexprimiert und die daraus entstehenden Membranleitfähigkeiten mittels der Two-Electrode-Voltage-Clamp-Methode (TEVC-method) elektrophysiologisch überprüft. Weiterhin soll ein möglicher Effekt verschiedener Konzentrationen des ABCB1-Proteins auf den ROMK-Kanal untersucht werden. Zur Klärung der Spezifität dieses Effektes wird mittels TEVC der Einfluss von ABCB1 auf ROMK mit dem Einfluss von ABCB1 auf den Kir2.1-Kanal verglichen. In einem letzten Schritt soll mittels Oberflächenexpressionsanalyse geklärt werden, ob es sich um einen Trafficking- oder um einen Gating-Effekt des ABCB1-Proteins auf den ROMK-Kanal handelt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die Standard-Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Sigma-Aldrich, Steinheim und C.Roth, Karlsruhe bezogen.

### 2.2 Instrumente und Hilfsmittel

Absaugpumpe		Neuberger Laboport, Freiburg, Deutschland
Ampere-chart	Ampere-chart multitron II	HT Infors AG, Bottmingen, Deutschland
Badklemme mit Erdung	VG-2A-x100, Virtual Ground Bath Clamp	Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA
Bloteinheit	Gießapparatur, Protein- Elektrophorese- und Blotkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Computer	Macintosh Performa 5200	Apple Inc., San José, CA, USA
DNA-Vacuum-Konzentrator	Speed Vac DNA plus	Heto Holten A/S, Allerød, Dänemark
Eppendorf-Cups	1,5 ml, steril	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon-Tube	15ml, 50ml, steril	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Filmentwickler	Curix 60	Agfa Gevaert AG, Deutschland
Gelkammer	B1A-Gelkammer	OwI Separation-Systems, Portsmouth, NH, USA
Gewebekulturplatten	24-Loch "Costar"	Corning Incorporated, Corning, NY, USA

Gewebekulturplatten	6-Loch "Costar"	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Headstage für Mikromanipulatoren	HS-2A-Headstage	Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA
Heizblock	TM 130-6	Heap Labor Consult GmbH, Bovenden, Deutschland
Instrument/Hilfsmittel	Nähere Bezeichnung	Hersteller
Kaltlichtquelle	KL 750 mit zweiarmigem Lichtleiter	Schott AG, Mainz, Deutschland
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco	Hereus Thermo Electron Corporation, Osterode, Deutschland
Lichtquelle mit Glasfaseroptik	Fiber-Lite High-Density- Illuminator	Dolan-Jenner Industries Inc., Boxborough, MA, USA
Luminometer	Glomax 20/20- Luminometer, Promega	Turner Biosystems, Sunnyvale, CA, USA
MacLab-Interface	MacLab 4s	ADInstruments, Australia
Magnetrührer	RCT-basic	IKA Werke GmbH&CoKG, Staufen, Deutschland
Messprogramm	Scope Version 3.5/s	Apple Inc., San José, CA, USA
Mikrokapillaren mit Filament	GB150TF-8P, Borosilikatglas-Kapillaren mit Filament, 80mm Länge, Außendurchmesser: 1,5mm, Innendurchmesser: 1,05mm	Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland

Mikrokapillaren ohne Filament	GB150T-8P, Borosilikatglas-Kapillaren ohne Filament, Länge: 80mm, Außendurchmesser: 1,5mm, Innendurchmesser: 1,05mm	Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland
Mikromanipulator(en)		Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikropipetten-Zieher	PUL 1-Pipette-Puller	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Mikropipetten-Zieher, vertikal	PA 10, Patch Pipette Puller	E.S.F.-Electronics, Göttingen, Deutschland
Nahtmaterial	Prolene 5-0	Ethicon, Johnson&Johnson Intl, St.Stevens Woluwe, Belgien
Nahtmaterial	Vicryl 4-0	Ethicon, Johnson&Johnson Intl, St.Stevens Woluwe, Belgien
Nanoliterinjektor	Nanoliter 2000 vollautomatisch	Firma World Precision Instruments, Sarasota USA
Oszilloskop	Oszilloskop 630	Voltcraft, Hirschau, Deutschland
Parafilm-Membran	Parafilm „M“	American National Can™, Chicago, IL, USA
Petrischalen	10cm Durchmesser	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
pH-Meter	MP 220	Mettler, Toledo, Spanien

Pipettenspitzen	RNAse-frei, 15µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rückkopplungsverstärker	GeneClamp 500 Amplifier	Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA
Rundbodenröhrchen	5ml, 75x12mm Durchmesser	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schüttler	Yello-Line OS 5 basic	IKA-Werke GmbH &CO. KG, Staufen, Deutschland
Spectrophotometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Bioscience, Cambridge UK
Statistikprogramm	Kaleidograph 3.51	Synergetic-Software, Reading, PA, USA
Stereomikroskop	Leica S8 Apo mit L2- Kaltlichtquelle 8V/20W	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Stereomikroskop	M3Z	Wild, Schweiz
Strom/Spannungs-Generator	“Biometra” Standard Power Pack P25	Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
TEVC-Basis	schwingungsgedämpfter Granit-Tisch mit Farradaykäfig	Eigenbau der Werkstatt der Philipps-Universität, Marburg, Deutschland
UV-Transluminator	TFX-20M	Fröbel Labortechnik, Lindau Deutschland
Vortex-Mixer	VM 300 neoLab 7-2020	Migge, Heidelberg, Deutschland
Waage 1	Explorer Pro	Ohaus Corporation, Pine Brooks, NJ, USA
Waage 2	Adventurer SL	Ohaus Corporation, Pine Brooks, NJ, USA

Tabelle 2: Instrumente und Hilfsmittel

## 2.3 Lösungen

### 2.3.1 Lösungen für Oozyten-Messung und -Aufbereitung

ND-96: Badlösung für Messungen

Antibiotikahaltige ND-96: Aufbewahrungslösung für Oozyten

KD-96: Badlösung für Messungen

OR-2: Kalziumfreie Lösung zur Oozytenpräparation

Alle Lösungen wurden aus einer 10-fach konzentrierten Stammlösung hergestellt.

Substanz	ND-96	Antibiotikahaltige ND-96	KD-96	OR-2
NaCl (mM)	96	96	0	82,5
KCl (mM)	2	2	98	2
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (mM)	1.8	1.8	1.8	0
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (mM)	1	1	1	1
HEPES (mM)	5	5	5	5
Natriumpyruvat (mM)	0	2,5	0	0
Theophyllin (mg/l)	0	90	0	0
Gentamycin (mg/l)	0	20	0	0
pH-Wert Titriert mit NaOH	7,5	7,5	7,5	7,5

**Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen**

### 2.3.2 Lösungen und Puffer für Western-Blot

#### Lysepuffer

150mM NaCl

20mM Tris/HCl, pH 7,5

1% Triton X 100

1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in 2ml

MQ-H<sub>2</sub>O (Ampura MilliQ-H<sub>2</sub>O, Fresenius-Kabi AG, Bad Homburg)

**10 x SDS-Sample-Puffer**

1,15 g SDS  
1,04 ml 3M Tris/HCl, pH 6,8  
5,00 ml Glycerol (100 %)  
0,2g Bromphenolblau  
auf 10 ml mit MQ-H<sub>2</sub>O aufgefüllt

**Tris- SDS pH 6,8**

3,94g Tris Base (0,25 M)  
0,2g SDS  
pH- Wert mit NaOH auf 6,8 eingestellt  
in 100 ml MQ-H<sub>2</sub>O

**Tris- SDS pH 8,8**

11,82g Tris HCL (0,25 M)  
0,2g SDS  
pH-Wert mit NaOH auf 8,8 eingestellt  
in 100 ml MQ-H<sub>2</sub>O

**10% APS**

1g Ammoniumpersulfat  
mit MQ-H<sub>2</sub>O auf 10 ml aufgefüllt

**Laufpuffer**

6g Tris- Base  
10g Glycin  
1g SDS  
pH- Wert mit NaOH auf 8,8 eingestellt  
mit MQ-H<sub>2</sub>O auf 1l aufgefüllt

**Transferpuffer**

3g Tris Base  
15g Glycin  
200ml Methanol  
mit MQ-H<sub>2</sub>O auf 1l aufgefüllt



**Stopplösung 4 %**

4g Magermilchpulver („Neuform“, Heirler Cenovis GmbH, Rudolphzell)  
in 100 ml TTBS

**Waschlösung (TTBS)**

2,51g Tris HCl

1,09g Tris Base

7,31g NaCl

500 µl Tween

pH- Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt

mit MQ-H<sub>2</sub>O auf 1l aufgefüllt

**2.4 Antikörper**

Erst-Antikörper: anti-HA-Antikörper (rat monoclonal antibody, 100µg/ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Zweit-Antikörper: Anti-rat-POD IgG-Antikörper (peroxidase conjugated Affini Pure F(ab')<sub>2</sub> Fragment goat anti-rat IgG, 0,8mg/ml, Jackson Immuno Research Europe Ltd.)

Verdünnung	Oberflächen-Lumineszenz-Detektion	Western-Blot
1.Antikörper	1:100	1:1000
2.Antikörper	1:500	1:10000

**Tabelle 4: Verdünnung der Antikörper**

**2.5 Oozytenpräparation****2.5.1 Oozytenisolierung**

Zur kurzzeitigen Betäubung wurde ein Exemplar von *Xenopus laevis* für 15-20min. in eine mit Eis versetzte Narkoselösung [3-Aminobenzoessäure-Ethylester-Methansulfonat = Tricain, 0.1-0.15% in Leitungswasser/Eis, pH 7.2] gesetzt. Sobald das Tier ruhig gestellt war, wurde es auf den Rücken gedreht und das Aussetzen des Umkehrreflexes sowie des respiratorischen Schluckreflexes durch Berühren der Kehlgasse geprüft. Das

betäubte Tier wurde in Rückenlage in einer Operationsschale auf Eis gelagert und die Bauchhaut im Areal des späteren Zugangs durch mehrmaliges trocknendes Auflegen von Zellstoff von der Schleimschicht befreit. Die abgetrocknete Lederhaut wurde mit einer Pinzette angehoben und daraufhin mit einer feinen Schere in den gebildeten Wulst geschnitten. Es resultierte eine in Körperlängsachse gerichtete operative Öffnung von 7-10mm Länge. Anschließend wurden ebenfalls das Peritoneum und die darunter liegende Muskelschicht mit einem Schnitt durchtrennt, wobei Haut und Muskelschicht von dem darunter liegenden Verdauungstrakt abgehoben wurden. Alle Gerätschaften wurden vor dem Eingriff mit Alkohol (100%) desinfiziert.

Nach Penetration der Bauchhaut wurde vorsichtig mit einer spitzen Pinzette das Ovar zwischen den abdominalen Organen (Darmschlingen, Leber, Fettkörper und Ovidukt) aufgesucht und vorsichtig durch die operative Öffnung gezogen. Das gewünschte Stück Mesovar wurde mit einer feinen Schere abgetrennt und in OR2-Lösung zwischengelagert. Um einen ersten Eindruck von der Güte der Oozyten zu erhalten, wurde eine kleine Probe unter einem Mikroskop begutachtet. Für den anschließenden Wundverschluß wurde resorbierbares chirurgisches Nahtmaterial der Stärke 4-0 (Vicryl 4-0) verwendet. In Ausnahmefällen wurde dies mit nicht-resorbierbarem Prolene-Nahtmaterial der Stärke 5-0 ersetzt. Die Muskelschicht und das Peritoneum wurden mit einer feinen chirurgischen Pinzette gefasst und mit zwei Einzelstich-Nähten verschlossen. Anschließend wurde die Haut in gleicher Weise vernäht.

Nach Abschluss der Operation wurde das Tier gründlich mit Leitungswasser abgespült und in eine Schale gesetzt, deren Boden maximal mit 1cm Wasser bedeckt war. Um Austrocknung zu vermeiden, wurde der Rücken des Tieres mit einem in Wasser getränkten Zelltuch bedeckt, bis der Schluckreflex wieder einsetzte und der Frosch kräftige Schwimmbewegungen zeigte. Nachdem das Tier vollkommen aus der Narkose erwacht war, wurde es zurück in ein Einzelbecken gegeben.

Nach 2 Wochen hat sich in der Regel im Bereich der Naht granuliertes Gewebe gebildet. Biopsien an demselben Tier wurden nicht in kürzeren Abständen als 4-6 Wochen durchgeführt, wobei die primär gesetzte Inzision nicht erneut als Zugang verwendet wurde. Insbesondere wurde darauf geachtet, dass bei der darauffolgenden Biopsie die jeweils kontralaterale Seite eröffnet wurde.

### **2.5.2 Oozytenaufbereitung**

Die Ovarialsäcke wurden in einer OR2-gefüllten Petrischale mit zwei spitzen Pinzetten mechanisch zerteilt, so dass nur noch zusammenhängende Reste des Sackes mit 5-10 Oozyten entstanden. Die Zerteilung sorgte für einen gleichmäßigen anschließenden Kollagenaseverdau. Nach Waschen in einem 50ml-Falcon mit OR2-Lösung bis zum Erreichen eines klaren Überstandes (6 bis 8 Mal) wurden die Oozyten in ein Wägeschälchen überführt und der OR2-Überstand sorgfältig abpipettiert. Dann wurden die Oozyten mit 2 mal 10ml Kollagenase-Lösung (20ml OR2 mit 40mg Kollagenase von *Clostridium histolyticum* Typ II) versetzt und für jeweils eine Stunde bei 16°C auf einem Schüttler bei 80rpm inkubiert. Dann wurde ein weiterer Waschgang durchgeführt und ein erneuter Kollagenase-Verdau für 1h angesetzt. Es wurde eine Ca<sup>2+</sup>-freie Lösung (OR2, siehe Tabelle 3) verwendet, da Ca<sup>2+</sup>-Ionen die Kollagenase inhibieren.

Nach 2h Inkubation waren die meisten der Oozyten vereinzelt und defollikuliert (mikroskopische Kontrolle). Der Kollagenaseverdau wurde beendet. Danach wurden die Oozyten zunächst erneut mit OR2 und anschließend mit ND96-Lösung, jeweils bis zum Erreichen eines klaren Überstandes und bis zur vollständigen Entfernung der Kollagenase, gewaschen.

Aus den so erhaltenen Oozyten aller Wachstums- und Reifestadien wurden unter dem Stereomikroskop die unbeschädigten Oozyten des Reifestadiums V und VI nach Dumont (Dumont J 1972) aussortiert. Die gewonnenen Oozyten wurden in Mengen zu ca. 40 Stück in 6-Loch-Gewebeplatten mit antibiotikahaltiger ND96-Lösung auf einem Schüttler bei 16°C aufbewahrt. Die Verwendung eines Schüttlers verhinderte ein Aneinanderhaften und eine Deformierung der Oozyten. Zur Begutachtung der Zellen wurde ein Leica-Stereo-Präparationsmikroskop verwendet, wobei die Beleuchtung durch eine 75 Watt-Kaltlichtquelle mit 2-armigem Lichtleiter optimiert wurde.

Es wurden, wie erwähnt, Oozyten des Stadiums-V und VI nach Dumont verwendet. Der Durchmesser beträgt 1.0-1.3mm, das Volumen variiert von 0.9-1.2µl (Dumont J 1972).

### **2.5.3 Injektion von m-RNA in die Oozyten**

Unter dem Leica Stereomikroskop (Okularvergrößerung 10-fach, Objektivvergrößerung 1,0 bis 8,0-fach) erfolgte entweder noch am Tag der Oozyten-Entnahme oder am darauffolgenden Tag die Injektion der m-RNA in die Oozyten. Aufgrund der Empfindlichkeit der m-RNA gegenüber dem abbauenden Enzym RNase wurde mit

Latexhandschuhen gearbeitet, der Arbeitsplatz wurde mit reinem Alkohol desinfiziert und es wurden RNase-freie Pipettenspitzen verwendet.

Die für die Injektion benötigten Mikroinjektionspipetten wurden mittels dem Mikropipettenpuller PUL 1 hergestellt. Um eine möglichst lange und schmale Pipettenspitze zu erhalten wurde bei einer „Heat“ von 9 und „Delay“ von 4 (automatischer Betrieb) gezogen. Es wurden dünnwandige Mikrokapillaren ohne Filament aus Borosilikatglas verwendet. Die Spitzen der frisch gezogenen Pipetten wurden mit Hilfe einer Pinzette unter mikroskopischer Kontrolle minimal verkürzt, so dass die Pipettenspitzenöffnung einen Durchmesser von ca. 10-15 $\mu$ m hatte. Dieser Durchmesser war ausreichend groß, um die m-RNA aufzusaugen und beim Injizieren in exakten Mengen wieder abzugeben. Gleichzeitig war die Spitze schmal genug, um die Oozytenmembran bei der Injektion nicht übermäßig zu gefährden.

Mit Hilfe eines vollautomatischen Nanoliterinjektors, der in einen Mikromanipulator eingespannt war, erfolgte die m-RNA-Injektion. Zunächst wurde die Injektionskapillare mit Mineralöl (light white oil, Sigma-Aldrich) gefüllt und auf den Stempel des Nanoliterinjektors gesetzt. Mit Hilfe des Mineralöls erreichte man eine luftblasenfreie Füllung der Kapillare und gewährleistete eine exakte Funktionalität der Injektion. Vor der tatsächlichen Oozyteninjektion wurde eine Funktionsprobe mit 3 $\mu$ l nucleasefreiem Wasser in der gleichen Weise wie unten beschrieben durchgeführt.

Die zur Injektion benötigte m-RNA wurde aus einem Pool von aliquotierten 1 $\mu$ l-Proben aus -80°C direkt vor der Injektion auf Eis aufgetaut und in den gewünschten Konstruktzusammensetzungen zu jeweils 3 $\mu$ l injektionsbereiten m-RNA-Proben kombiniert.

Es wurden jeweils Konstrukte von 40-50 Oozyten mit m-RNA-Lösung injiziert. Für ein zu injizierendes Konstrukt wurde die entsprechende 3 $\mu$ l-Probe auf eine über eine Petrischale gespannte Parafilm-Membran aufgetragen und von dort in die Mikropipette gesogen. Die Oozyten wurden zur Fixierung auf eine, speziell für diesen Zweck konstruierte, Petrischale mit eingelegter Schuhsohle und Gitternetzstruktur (Eigenbau des Labors) in antibiotikahaltige ND-96-Lösung gelegt. Zur Injektion wurde nun die Spitze der Injektionskapillare in einem Winkel von ca. 45° an die Oozyte herangefahren und durch die Oozytenmembran eingestochen. 60nl m-RNA-Lösung wurden in jede Oozyte injiziert. Die korrekte Injektion wurde an einem leichten Schwellen der Oozyte sichtbar. Je nach Konstrukt wurden zwischen 0 und 11ng m-RNA pro Zelle injiziert.

Nach der Injektion wurden die Oozyten in 24-Loch-Gewebekulturplatten mit antibiotikahaltiger ND96-Lösung überführt (ca. 10 Oozyten/Loch). Die Oozyten wurden bei 16°C aufbewahrt. Am Tag nach der Injektion wurden apoptotische Zellen nach den Kriterien: „Depigmentierung“, „Fleckenbildung“ und „milchiger Aspekt“ aussortiert, sowie die antibiotika-haltige ND96-Lösung ausgetauscht. Dieser Schritt war nötig, um die gesunden Oozyten nicht durch die toxischen Zytokine der apoptotischen Zellen zu gefährden. Nach 2-4 Tagen waren genügend Proteine der jeweiligen m-RNA exprimiert, um die entsprechenden Funktionen analysieren zu können.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

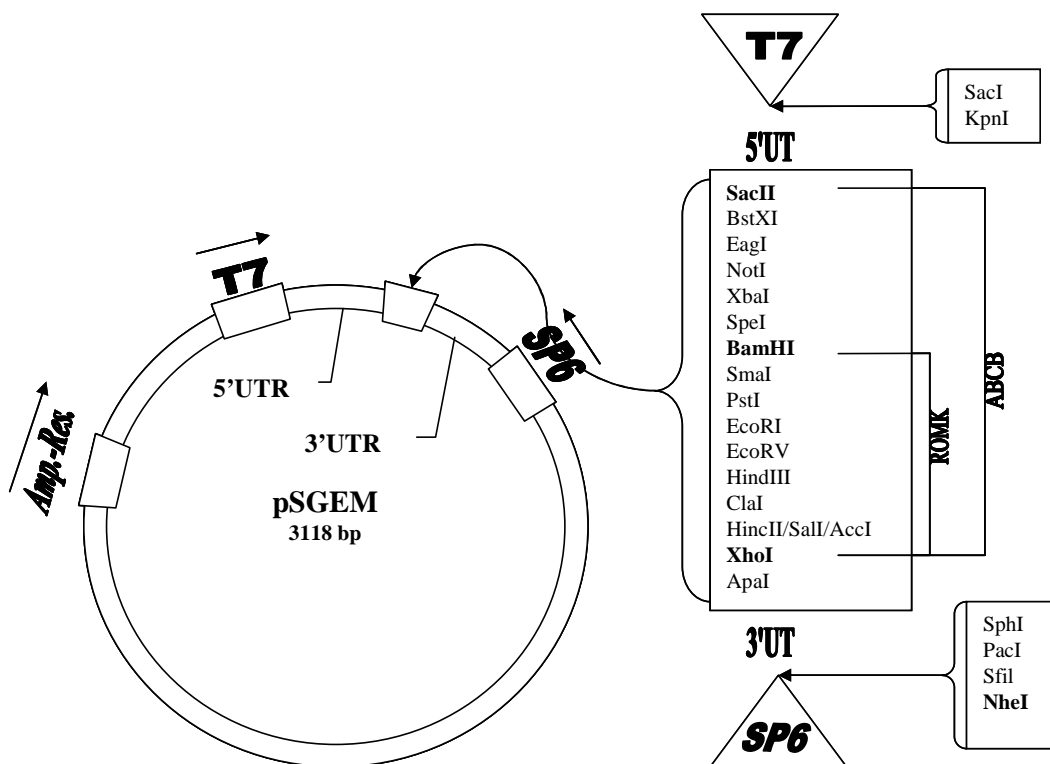
### 2.6.1 Molekulares Subklonieren

Die DNA für die Proteine ROMK, ROMK-HA und ABCB wurden in das Vektorplasmid pSGEM (siehe Abbildung 6) unter Verwendung der in Tabelle 5 zusammengefassten Restriktionsenzyme subkloniert.

Zur Transfektion und Vervielfältigung wurden DH5 $\alpha$ -kompetente E.Coli-Zellen (Invitrogen Corp., Karlsruhe) verwendet. Diese wurde zunächst auf Eis aufgetaut und dann in vorgekühlte 1,5ml Eppendorfcups zu je 50 $\mu$ l aliquotiert. Zu jeder Probe wurden 10ng DNA des jeweiligen Subklons (Vektorplasmid inklusive Insert) hinzugefügt und durch Schwenken vorsichtig gemixt. Zellen und Plasmid wurden für 30min zusammen auf Eis inkubiert. Zur eigentlichen Transformation wurden die Proben mit einem 30s Hitzeschock behandelt und erneut für 2min auf Eis gelegt. Um eine erste Proliferation zu erreichen, wurden die Zellen nun für 1h bei 37°C und 225rpm in 1ml sterilem LB-Nähr-Medium (Luria-Bertani-Medium: 10g/l Bacto Trypton, 10g NaCl, 5g/l Hefeextrakt) im Heizblock inkubiert.

Zur Selektion der transformierten Zellen wurden davon unter sterilen Bedingungen jeweils 200 $\mu$ l auf vorgewärmten Ampicillin-haltigen (100 $\mu$ g/ml) LB-Agarplatten (10g/l Bacto Trypton, 10g/l NaCl, 5g/l Hefeextrakt, 15g/l Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 2-4 Kolonien eines jeden Klons einzeln in jeweils 5ml steriles LB-Medium überführt und zur Vermehrung erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Ca. 500 $\mu$ l der so erhaltenen Bakteriensuspension wurden als Glycerol-Stock bei -80°C eingefroren. Die übrigen 4,5ml wurden für 15min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die darauffolgende DNA Minipräparation wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland) streng nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Bakterien-Pellet wurde in 250µl Puffer P I resuspendiert und in ein 1,5ml Eppendorf-Cup überführt, mit 250µl Puffer PII und 350µl Puffer N3 versetzt und für 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die QIAprep spin Filter-Säule übertragen und dann bei 13000rpm für 60s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die gebundene DNA mit 500µl Puffer PB durch zentrifugieren für 60s bei 13000rpm gewaschen. Eine zweite Waschung erfolgte mit 750µl Puffer PE in gleicher Weise. Der Durchfluss wurde verworfen und die Filter-Säule ein zweites Mal zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Zum Auswaschen und Aufnehmen der gereinigten DNA wurde auf die QIAprep Spin Filter-Säule 50µl entionisiertes Wasser gegeben und für 60s bei 13000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in einem 1,5ml Eppendorf-Cup aufgenommen.



**Abbildung 6: pSGEM Vektormap**

**Amp.-Res.:** Ampicillin-Resistenz, **5'/3'UTR:** 5'/3'-untranslatierte Region des Xenopus  $\beta$ -Globingens, **T7** und **SP6:** Polymerasepromotoren

Ionenkanal bzw. Insertbezeichnung	Vektor	Enzym 1	Enzym 2
ROMK	pSGEM	BamH I	Xho I
ROMK-HA	pSGEM	BamH I	Xho I
ABCB	pSGEM	Sac II	Xho I

**Tabelle 5: Verwendete Inserts, Vektoren und entsprechende Restriktionsenzyme**

### 2.6.2 *m*-RNA Synthese und Aufreinigung

#### Linearisierung der DNA:

Die Plasmid-DNA wurde in folgendem Reaktionsansatz bei 37°C für 16h zur Linearisierung inkubiert (siehe auch Tabelle 6):

10µg Plasmid-DNA

5µl Restriktionsenzym-puffer (10-fach konzentriert)

50u Restriktionsenzym Nhe I ( New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)

Das Gesamtvolumen wurde auf 50µl mit MQ-H<sub>2</sub>O aufgefüllt

Ionenkanal bzw. Insertbezeichnung	Polymerasepromotor	Enzym zur Linearisierung
ROMK	T7	Nhe I
ROMK-HA	T7	Nhe I
ABCB	T7	Nhe I
K <sub>ir</sub> 2.1	T7	Nhe I

**Tabelle 6: Inserts, Promotoren und Restriktionsenzyme für die Linearisierung**

#### Reinigung der linearisierten DNA:

Die Reinigung wurde mit dem High PCR Product Purification Kit von Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Zur DNA-Probe wurden zunächst 500µl Binding-Buffer gegeben, gemixt, dann auf den High Pure Filter gegeben und für 60s bei 13000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Darauf wurden 500µl Wasch-Puffer auf den Filter gegeben und erneut für 60s bei 13000rpm zentrifugiert, der Durchfluss wiederum verworfen. Dieser Vorgang wurde mit 200 µl Wasch-Puffer wiederholt und draufhin der Filter zusätzlich für 60s

zentrifugiert. Zur Lösung der DNA wurden 50µl entionisiertes Wasser auf den Filter gegeben und bei 13000rpm für 60s zentrifugiert. Die nun eluierte DNA wurde in einem 1,5ml Eppendorf-Cup aufgenommen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine 1µl-Probe 1:100 verdünnt und spectro-photometrisch gemessen.

Die Qualitätskontrolle erfolgte mittels Gelelektrophorese im Agarosegel (50ml TAE, 0,8% Agarose, 1,5µl Ethidiumbromid (5mg/ml), 100V, 15-30min). Ein erfolgreicher Insert-Release konnte an zwei deutlichen DNA-Banden (Insert und Vektor) im entsprechenden Größenverhältnis erkannt werden.

### **m-RNA Synthese:**

Die Synthese der m-RNA erfolgte nach Herstellerangabe mit dem mMessage mMachine High Yield Capped RNA Transcription Kit von Ambion (Ambion Inc., Austin, Texas, USA).

Folgender 10 µl Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37° inkubiert:

- 500ng linearisierte DNA (gelöst in maximal 3µl H<sub>2</sub>O)
- 1µl T7-Puffer (10-fach konzentriert)
- 5µl NTP/Cap (2-fach konzentriert)
- 1µl T7 Enzymmix (RNA-Polymerase)
- ad 10µl H<sub>2</sub>O

### **Fällung und Reinigung der m-RNA:**

Die Fällung und Aufreinigung der m-RNA erfolgte ebenfalls mittels dem mMessage mMachine High Yield Capped RNA Transcription Kit von Ambion. Die m-RNA wurde durch Zugabe von 15µl H<sub>2</sub>O und 12,5µl Lithium-Clorid-Fällungslösung und anschließendes Vortexen gemischt und bei -20°C für 1-2h präzipitiert. Nach Zentrifugieren bei 4°C für 15min und 13000rpm wurde der Überstand abgenommen und das m-RNA-Pellet mit 500µl Ethanol (70%ig) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 4°C und 13000rpm für 15min und Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in einem Speed-Vac-Konzentrator für 5min getrocknet. Das gereinigte m-RNA-Pellet wurde in 15µl nucleasefreiem Wasser aufgenommen.

Die Qualität der m-RNA wurde in einem Agarosegel (50ml TAE, 0,8% Agarose, 1,5µl Ethidiumbromid (5mg/ml)) überprüft. Zur Größeneinordnung diente ein 1 kB Marker (5µl) (mMmM-Kit). Eine m-RNA-Probe von 400ng (ca 0,5-1µl) wurde mit 8µl H<sub>2</sub>O und 2µl Gel Loading Buffer aus dem mMmM-Kit versetzt. Nachdem Probe und Marker



aufgetragen wurden, lief das Gel bei einer Spannung von 100 Volt für ca. 45min in einer B1A-Gelkammer.

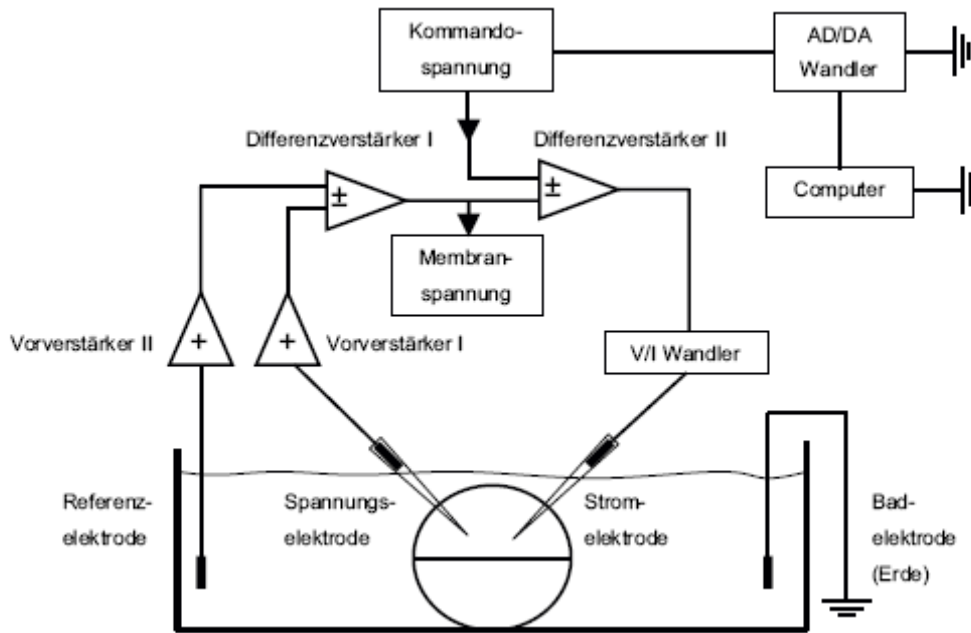
Bei Nachweis einer m-RNA Bande im UV-Transluminator wurde die Konzentrationsbestimmung, wie zuvor bei der DNA-Linearisierung beschrieben, spectrophotometrisch durchgeführt. Die m-RNA wurde dann in der für spätere Injektionen benötigten Menge aliquotiert (ca.10 Eppendorf Cups mit jeweils 1µl m-RNA, Rest als Stock) und bei -80°C eingefrohren.

## 2.7 Elektrophysiologische Methoden

### 2.7.1 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (= *Two Electrode Voltage Clamp: TEVC*)

Für die meisten, der für unsere Fragestellungen erforderlichen, elektrophysiologischen Verfahren an *Xenopus* Oozyten muss das Membranpotential kontrolliert werden. Dies kann mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme geschehen. Eine intrazelluläre Elektrode misst das aktuelle intrazelluläre Potential (Spannungselektrode). Eine zweite intrazelluläre Elektrode (Stromelektrode) wird benötigt, um genau soviel Strom einzuspeisen, wie notwendig ist, damit das angestrebte Potential beibehalten wird. Dies wird über eine Rückkopplungsschleife gewährleistet, einem Hauptbestandteil eines Voltage-Clamp Verstärkers. Der zur Aufrechterhaltung des geklemmten Potentials benötigte Strom ist der gemessene Parameter und stellt ein direktes Maß für die Kanalströme durch die Zellmembran dar. Wie akkurat dieser Parameter gemessen werden kann, hängt zudem von zwei zusätzlichen Badelektroden ab; einer Strompassierenden, geerdeten Elektrode und einer Referenzelektrode.

Der Gebrauch von zwei Badelektroden hat den Vorteil, dass große Ströme die geerdete Badelektrode passieren und die Referenzelektrode nicht durch Stromfluss polarisiert werden kann (Stühmer W 1992). Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung des Messprinzips. Das Membranpotential wird als Differenz zwischen der intrazellulären Spannungselektrode und der Referenzelektrode gemessen.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (nach v. Rosenberg Lipinsky)**

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Messprinzips einer Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Die Vorverstärker I + II verstärken das Signal der Spannungselektrode bzw. der Referenzelektrode, bevor die Signale in den Differenzverstärker I fließen. Hier wird die an der Oozytenmembran anliegende Spannung ermittelt. Differenzverstärker II vergleicht die vom Computer über einen AD/DA-Wandler applizierte Kommandospannung mit der an der Oozytenmembran anliegenden Spannung. Die hier ermittelte Differenz ist der zu messende Parameter und stellt ein direktes Maß für die Kanalströme dar. Um die Membranspannung der Kommandospannung anzugleichen, wird über einen V/I-Wandler genau das Maß an Strom auf die Zelle appliziert, dass an Differenzverstärker II gemessen wurde. Eine zweite Badelektrode erdet das Bad.

### 2.7.2 Der Messaufbau

Der mechanooptische Teil der Messapparatur umfasste eine Badkammer mit Perfusionssystem, zwei manuelle Mikromanipulatoren und ein Stereomikroskop inklusive einer Lichtquelle mit Glasfibreroptik. Zur mechanischen Entkopplung des Aufbaus war dieser auf einem schwingungsgedämpften Granit-Tisch montiert. Zusätzlich sorgte ein Faradaykäfig für eine Abschirmung gegenüber elektrischen Störungen der Umgebung. Die leitenden Bestandteile der Messeinheit wurden über einen Punkt geerdet. Der Zulauf der jeweiligen Badlösung erfolgte aus entsprechenden Vorratsbehältern, aus denen, durch hydrostatischen Druck getrieben, die Lösungen über einen Silikonschlauch in die Badkammer geleitet werden konnten. Die Flussgeschwindigkeit betrug ca. 20ml/min, was den kompletten Austausch der Lösung in der Badkammer innerhalb von 10 bis 15s sicherstellte. Das Absaugen geschah

ebenfalls über einen Silikonschlauch, der seinerseits über ein Wasserschloss mit einer Absaugpumpe verbunden war.

An den Mikromanipulatoren war jeweils eine HS-2A-Headstage befestigt. Diese waren mit dem Rückkopplungsverstärker konnektiert. An den Headstages befanden sich Elektrodenhalter mit einem Ag/AgCl-Elektrodendraht. Um das saubere Einstechen in die Oozyten zu gewährleisten, wurden mit einem vertikalen Pipetten-Zieher Mikropipetten aus dünnwandigen Mikrokappillaren mit Filament gezogen. Diese wurden mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und an den Elektrodenhaltern befestigt, wobei die Ag/AgCl-Elektrodendrähte in die KCl-gefüllte Mikropipette eintauchten. Die Mikroelektroden hatten bei allen Versuchen einen Widerstand zwischen 0,5 und 2,0 M $\Omega$ .

Alle Daten wurden über den Differenzverstärker und über ein MacLab-Interface in einem Macintosh Computer aufgenommen und mit Hilfe des Programms Scope 3.5/s ausgewertet. Zum Monitoring der Spannungsklemme diente ein Oszilloskop, mittels dessen die Verläufe der angelegten Spannung sowie die tatsächliche Membranspannung sichtbar gemacht wurden. Diese Geräte befanden sich außerhalb des Farradayschen Käfigs.

#### **Exemplarischer Verlauf eines Messvorganges:**

Die zu messende Oozyte wurde zentriert in die Badkammer gelegt, die Elektroden bis auf wenige Millimeter an die Zelle herangefahren, so dass diese sich in der Badlösung befanden.

Beide Elektroden wurden auf 0mV geeicht. Daraufhin wurde die Oozyte vorsichtig penetriert. Zur Überprüfung der Güte der Oozyte wurde diese nun mit ND96 Badlösung umspült. Bei ROMK-injizierten, gut exprimierenden Oozyten konnte zügig ein Membranpotential von -80 bis -100mV festgestellt werden, ein Potential, was in diesem Fall dem Gleichgewichtspotential für Kalium nahe kommt (Silbernagl S 2003). Für Oozyten, die keine Kaliumkanal-Proteine exprimierten galt ein Membranpotential zwischen -30 und -50 mV als Zeichen für eine ausreichende Stabilität der Zellmembran. Anschließend wurde die eigentliche Messung der Kanalströme in der KD96-Badlösung durchgeführt. Ein Messdurchgang bestand aus 11 Einzelmessungen in Reihe bei aktiv geklemmten Potentialen zwischen -100 und +60 mV (Abstand in 20mV-Schritten).

Die Experimente wurden mindestens dreimal mit jeweils unterschiedlichen Oozyten von verschiedenen Fröschen durchgeführt. Die Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe

des t-Tests (ungepaart mit ungleicher Varianz) überprüft. Das Signifikanzlevel lag bei  $p \leq 0,05$ .

Die Messungen sowie statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Programme Scope 3.5 und Kaleidograph 3.51 durchgeführt.

## 2.8 Biochemische Methoden

### 2.8.1 Oberflächen-Lumineszenzdetektion

Bei der Oberflächen-Lumineszenzdetektion werden extrazellulär HA (Hämagglutinin)-markierte Proteine an der Oberfläche von Oozyten quantitativ bestimmt. In dieser Arbeit handelt es sich ausschließlich um HA-markiertes ROMK-Kanalprotein zur Oberflächenquantifizierung.

Dazu wurden wie unter 2.3.3 beschrieben Oozyten mit 1-11 ng m-RNA injiziert und am darauffolgenden Tag in Konstrukten von 15-20 Zellen in 5 ml Rundbodenröhrchen sortiert. Jedes Konstrukt wurde mit 400  $\mu$ l Blockier-Puffer-Lösung (ND96 + 1% BSA) versetzt und die Oocyten bei 4°C für 30 min blockiert.

Nachdem der Überstand vorsichtig abgenommen war, wurden die Oozytenkonstrukte mit 200  $\mu$ l Erst-Antikörper: anti-HA-Antikörper (1:100 verdünnt mit Blockierpuffer, rat monoclonal antibody, 100  $\mu$ g/ $\mu$ l, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) für 60 min bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Oozyten in Mengen zu 10 für insgesamt 30 min in 24-Loch-Gewebekultur-Platten mit Blockierpuffer gewaschen. Dabei wurden die Oozyten in Abständen von 5 min jeweils in ein neues mit 2 ml frischem Puffer gefülltes Well überführt. Bei der darauffolgenden Inkubation mit 200  $\mu$ l Zweit-Antikörper: Anti-rat-Antikörper wurde ein in Blockierpuffer 1:500 verdünnter Anti-rat-POD IgG-Antikörper verwendet (peroxidase conjugated Affini Pure F(ab')<sub>2</sub> Fragment goat anti-rat IgG, Jackson Immuno Research Europe Ltd.). Die Inkubation der Oozytenkonstrukte wurde hier ebenfalls für 60 min bei 4°C durchgeführt. Der anschließende Waschgang erfolgte erneut in 24-Loch-Gewebe-Kultur-Platten für 60 min auf Eis, dabei wurden wiederum die Oozyten alle 5 min in ein neues, mit 2 ml Blockierpuffer gefülltes Well überführt. Abschließend wurden die Konstrukte für 15 min in ND-96-Lösung ohne BSA gewaschen. Dies geschah in 6-Loch-Gewebe-Kultur-Platten mit jeweils 3 ml Lösung und 20 Oozyten pro Well.

Die Messung wurde in einem Glomax<sup>TM</sup> - Luminometer durchgeführt. Dazu wurden die Oozyten in Eppendorf-Cups jeweils mit 20  $\mu$ l Lumineszenz-Substrat vereinzelt (Super

Signal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate von Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn). Messwerte wurden in RLU/s (relative light units per second) aufgezeichnet. Das Lumineszenz-Substrat wurde 2h zuvor nach Angaben des Herstellers angesetzt und im Dunkeln aufbewahrt. Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden bei 4°C vorgekühlt. Erhobene Daten wurden in diesem Fall manuell in einen Macintosh-Computer eingegeben und mittels des Programms Kaleidograph 3.51 ausgewertet.

### **2.8.2 Western Blot**

#### **Gel-Herstellung:**

Zunächst wurde ein Zwei-Komponenten-Gel zur Proteintrennung gegossen. Eine mit 100% EtOH gereinigte Bio-Rad Gießapparatur wurde mit ca. 8ml Acrylamid-Trenngel luftblasenfrei gefüllt. Nach Polymerisation des Trenngels wurde die Apparatur mit ca. 2ml Sammelgel aufgefüllt und zur Präformation von Geltaschen wurde ein Kamm eingesetzt.

#### **Trenngel 10%**

2,3 ml 30 % Acrylamid (National Diagnostics, Atlanta, USA)

3,4 ml Tris SDS pH 8,8

1,2 ml MQ- Wasser

10 µl TEMED (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

40 µl APS 10 %

#### **Sammelgel 4%**

0,3 ml 30 % Acrylamid

1,0 ml Tris SDS pH 6,8

0,8 ml MQ- Wasser

3 µl TEMED

10 µl APS 10%

**Lyse von Oozyten:**

Oozyten, die am Tag zuvor mit jeweils 10ng der gewünschten RNA injiziert worden waren, wurden in Mengen zu 10 mit 200µl Lysepuffer versetzt. Durch auf- und abpipettieren mit einer 200µl-Eppendorfpipette auf Eis wurde ein homogenes Lysat erstellt. Nach Inkubation auf Eis für 5 min wurde das Lysat 15min bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 100µl abgenommen und mit 12,5µl 10 x SDS-Proben-Puffer und 5µl β-Mercaptoethanol versetzt. Dann wurde die Probe zur Proteindenaturierung für 10 min im 50°C Wasserbad erhitzt. Die Probe wurde entweder bei -20°C aufbewahrt oder sofort zur Gelelektrophorese bereitgestellt.

**Gelelektrophorese:**

In die präformierten Geltaschen wurden 15µl Proteinprobe gefüllt, in die äußeren beiden jeweils 10µl Full Range Rainbow Marker (Amersham, Buckinghamshire, UK). Es wurden zunächst 200mA-Stromstärke bei einer Spannung von 20V für 10min angelegt, damit die Proben in das Gel eindiffundieren konnten, anschließend erfolgte die Elektrophorese bei 200 mA und 60-100V für 100-200min unter regelmäßiger visueller Kontrolle. Diese Schritte erfolgten in einer Bio-Rad Protein-Elektrophorese-Kammer.

**Blot:**

Das Gel wurde nach beenden der Elektrophorese in eiskaltem Transferpuffer äquilibriert. Die Nitro-Cellulose-Transfer-Membran (Hybond-C extra, Amersham Life Science, Braunschweig) wurde der Gelgröße entsprechend zugeschnitten und für kurze Zeit in Transferpuffer inkubiert. Ca. 5cm große Stücke Blotpapier (Schleicher & Schuell Papier, Dassel) wurden mit Transferpuffer getränkt und mit dem Gel und der Transfermembran folgendermaßen in die Blotkammer geschichtet:

**Kathode (-)**

**Filterpapier**

**SDS- Acrylamid- Gel**

**Transfermembran**

**Filterpapier**

**Anode (+)**

Der Transfer erfolgte innerhalb von 90min bei Raumtemperatur unter ständiger Zirkulation des Transferpuffers, konstanten 200mA Stromstärke und 100V-Spannung in der Blotkammer. Zur Kontrolle der Übertragungseffizienz wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Trägermembran wurde für 3-4min in der Ponceau Blau-Lösung (Sigma-Aldrich, Mannheim) unter Schwenken inkubiert. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch Spülen in MQ-H<sub>2</sub>O entfernt. Die übertragenen Proteine wurden als rote Banden sichtbar und die Position der Eichproteine mit einem Kugelschreiber markiert. Anschließend wurde die Membran in Stopplösung für ca. 16h bei 4°C inkubiert.

Die Antikörperbehandlung der Membran erfolgte nach folgendem Schema:

3 x 5min Spülen bei Raumtemperatur in TTBS

90min Inkubation bei Raumtemperatur in mit Stopplösung verdünntem Erstantikörper

3 x 5min Spülen bei Raumtemperatur in TTBS

60 min Inkubation in mit Stopplösung verdünntem Zweitantikörper

3 x 10min Spülen in TTBS

Die anschließende Fluoreszenzfärbung erfolgte mit dem ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham, Buckinghamshire, UK). Dazu wurde die Transfermembran auf Parafilm ausgelegt und mit der Färbelösung beträufelt, bis die Oberfläche komplett bedeckt war. Dann erfolgte eine Inkubation unter Lichtabschluss für 10min. Anschließend wurde die Membran abgetrocknet und in Klarsichtfolie gelegt. Bildgebende Dokumentation erfolgte durch Belichtung und Entwicklung eines Hyperfilms mit der gebundenen Fluoreszenz für 1,5 bis 30min in einem Curix 60-Filmentwickler.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Einführung

Bei den Experimenten wurden die verwendeten Oozyten, wenn nicht anders vermerkt, mit den in Tabelle 7 angegebenen m-RNA-Mengen injiziert.

	ROMK	ROMK-HA	ABCB	Barttin	Kir2.1
TEVC-Methode	5pg	250 pg	10ng	10ng	20pg
Oberflächen-Lumineszenzdetektion		1ng	10ng		
Western-Blot		1ng	10ng		

**Tabelle 7: Injizierte m-RNA-Mengen**

Für alle Experimente mit der TEVC galt für die Anzahl der Oozyten-Messungen (n) pro Konstrukt  $9 \leq n \leq 12$ .

Für die Oberflächen-Lumineszenzdetektion galt pro Konstrukt  $15 \leq n \leq 20$ .

Bei TEVC-Messungen mit ROMK-Kanalprotein liegt die maximale Injektionsmenge für ROMK-m-RNA bei 5pg/Oozyte, da sonst zu starke den Messbereich der TEVC überschreitende Ströme entstehen.

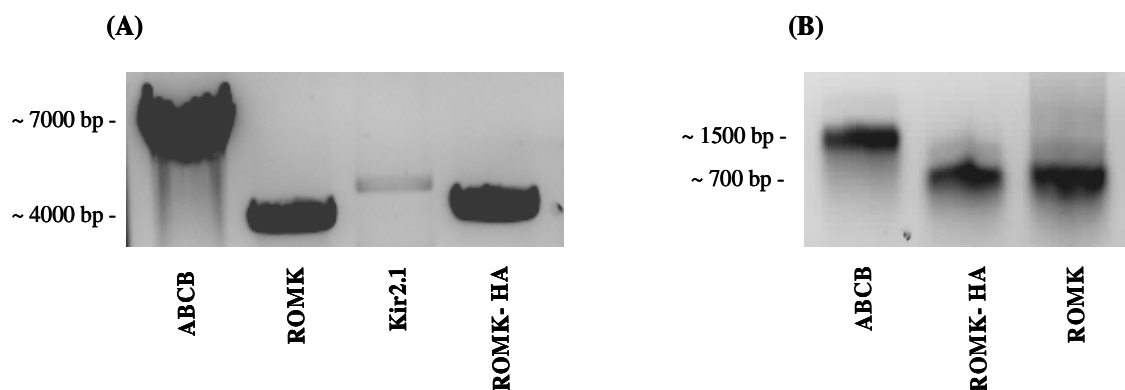
Für Messungen mit ROMK-HA lag der „Cut off“ bei 250pg/Oozyte für messbare Ströme. Die Differenz zwischen ROMK- und ROMK-HA-Injektionsmengen erklären sich z.T. aus den unterschiedlichen Messzeitpunkten post injectionem. ROMK-injizierte Oozyten wurden nach 72-96h gemessen, ROMK-HA-injizierte Oozyten schon nach 48h. Außerdem scheint HA-markiertes ROMK eine etwas geringere Aktivität aufzuweisen als der Wildtyp ROMK, was durch eine höhere Injektionsmenge ausgeglichen werden kann.

Die Injektionsmenge von 10ng ABCB-m-RNA/Oozyte ergibt sich aus dem Labor-Standard für Untersuchungen von ROMK-Protein-Interaktionen.



### 3.2 Linearisierte DNA-Fragmente der erstellten Subklone sowie m-RNA-Produkte der verwendeten Proteine ROMK, ROMK-HA und ABCB

Die Abbildung 8A zeigt exemplarisch die Banden der erfolgreich subklonierten und linearisierten DNA des Vektorplasmids pSGEM inklusive der jeweiligen DNA der Proteine ROMK, ROMK-HA und ABCB im Agarosegel. Für den ABCB Subklon liegt die Bande bei ca. 7000bp für den ROMK- und ROMK-HA-Subklon bei ca. 4000 bp. Die Kir2.1 DNA wurde freundlicher Weise vom Labor zur Verfügung gestellt und liegt zwischen 4000 und 5000bp. Abbildung 8B zeigt exemplarisch den Nachweis synthetisierter m-RNA zur Injektion in die Oozyten. ROMK und ROMK-HA-m-RNA-Proben zeigen eine deutliche Bande bei ca. 700bp. Bei ABCB-m-RNA-Proben entsteht eine Bande bei ca. 1500 bp. Kir2.1 m-RNA-Daten sind hier nicht gezeigt.



**Abbildung 8: Linearisierte DNA-Fragmente sowie m-RNA in der Gelelektrophorese**

Linearisierte DNA-Fragmente: ABCB (ca. 7000 bp), ROMK, ROMK-HA (ca. 4000 bp), Kir2.1 (ca. 4500 bp) [A]; m-RNA: ABCB (ca. 1500 bp), ROMK, ROMK-HA (ca. 700 bp) [B]

### 3.3 Funktionelle Konsequenz der Interaktion von ROMK und ABCB

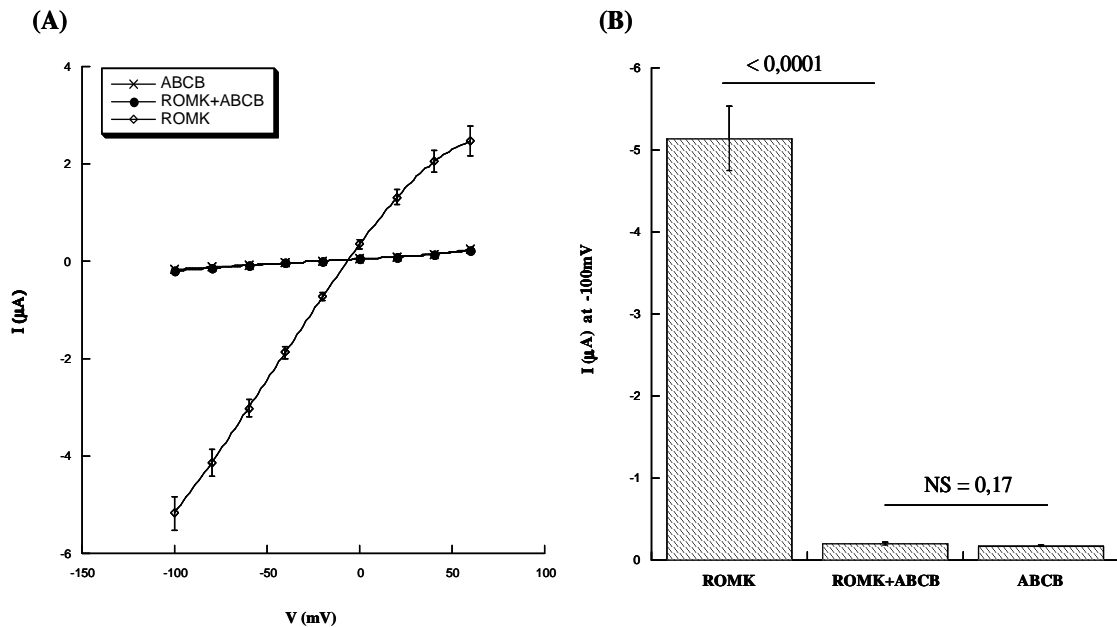
Zur Feststellung eines funktionellen Zusammenhangs der Proteine ROMK und ABCB wurden diese in *Xenopus* Oozyten koexprimiert und mit ROMK injizierten Oozyten verglichen. ABCB injizierte Oozyten dienten als Kontrolle.

Bei den Messungen mit der TEVC-Methode zeigten ROMK-Kanäle in mit 5pg m-RNA injizierten *Xenopus* Oozyten nach 2-4 Tagen Expression ROMK-Ströme über die Zellmembran, charakterisiert durch eine schwache Einwärtsgleichrichtung. Die Oozyten wurden zwischen  $-100\text{mV}$  und  $+60\text{mV}$  Membranspannung geklemmt, wodurch die charakteristische, in Abbildung 9A gezeigte Strom-Spannungs-Beziehung für ROMK-

exprimierende Oozyten entstand. In ROMK und ABCB koexprimierenden Oozyten ist hingegen ein ROMK-Strom nicht erkennbar, die Kurve verläuft sehr flach und ist nahezu identisch mit dem Verhalten bei ausschließlicher ABCB Injektion (Abbildung 9).

Für die Ströme bei  $-100\text{mV}$  Klemmspannung gilt: ROMK-Expression führt zu einem Auswärtsstrom von im Mittel  $5,13\mu\text{A}$ , während bei der Koexpression von ROMK mit ABCB vernachlässigbare Ströme fließen (Mittelwert  $M=0,2\mu\text{A}$ ). Letzteres gilt ebenfalls für die Kontrolle mit ausschließlicher ABCB-Expression ( $M=0,17\mu\text{A}$ ; Differenz mit  $p=0,17$  NS, Abbildung 9B).

Im heterologen Expressionssystem scheint die Koexpression von ABCB mit ROMK massiv den ROMK-vermittelten Strom über die Zellmembran zu verringern.

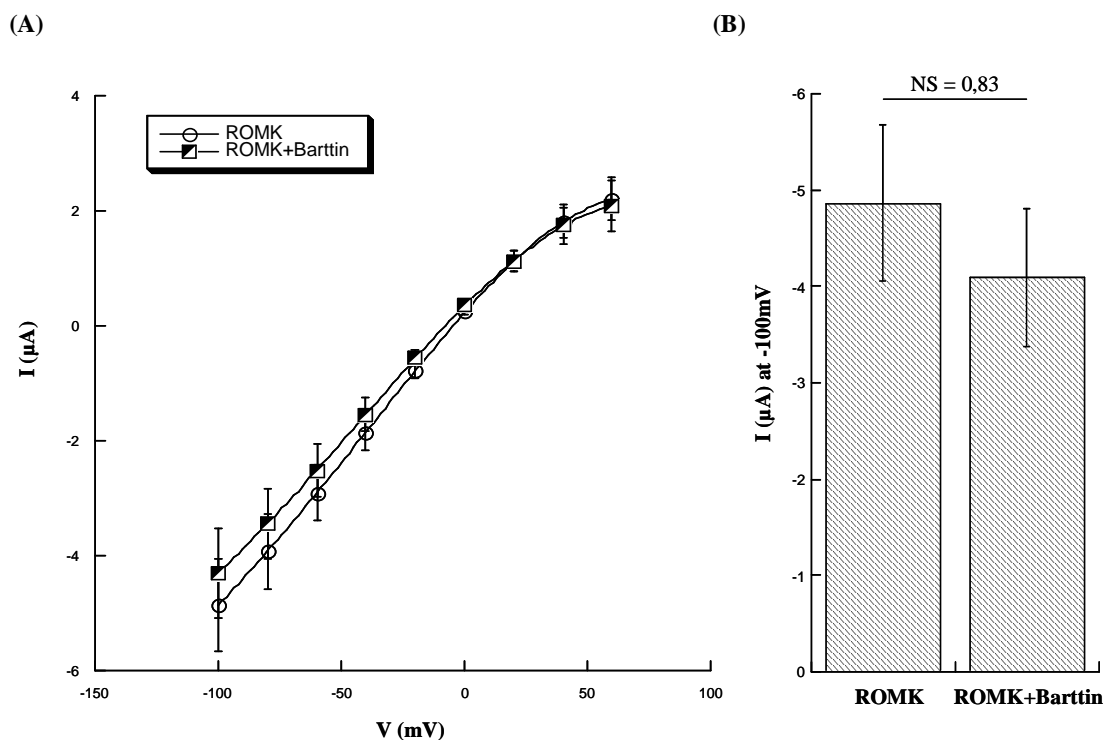


**Abbildung 9: Inhibition der ROMK-Kanäle durch ABCB**

Strom-Spannungs-Beziehung (Stromstärke I in  $\mu\text{A}$ , Spannung V in mV) für ROMK, ROMK plus ABCB und ABCB [A]; gemittelte Ströme I in  $\mu\text{A}$  bei einer Klemmspannung von  $-100\text{mV}$  für ROMK, ROMK plus ABCB und ABCB [B]

### 3.4 Ergebnis der Koexpression von Barttin und ROMK

Zur Abgrenzung eines unspezifischen, quantitativen Effektes auf ROMK durch parallele Expression großer Mengen eines zweiten Proteins wurde eine Versuchsreihe mit ROMK+Barttin-Koexpression durchgeführt. Barttin stellt die funktionelle  $\beta$ -Untereinheit der ClCKa+b-Kanäle in verschiedenen Abschnitten des Nephrons dar (tAL + TAL, DCT). Isoliert exprimiert induziert Barttin keine zusätzliche Ionenleitfähigkeit in Oozyten-Membranen. Es wurden analog zur ROMK-ABCB Interaktion 10ng Barttin mit 5pg ROMK in die Oozyten injiziert. Die Differenz der gemessenen Ströme bei -100mV Klemmspannung ist für ROMK und ROMK+Barttin-exprimierende Oozyten im Mittel nicht signifikant ( $p=0,83$ ) (Abbildung 10). Im Gegenteil zum massiven Effekt von ABCB auf ROMK (Vgl. Abbildung 9) kommt es hier zu keiner signifikanten Beeinflussung von ROMK durch Barttin.



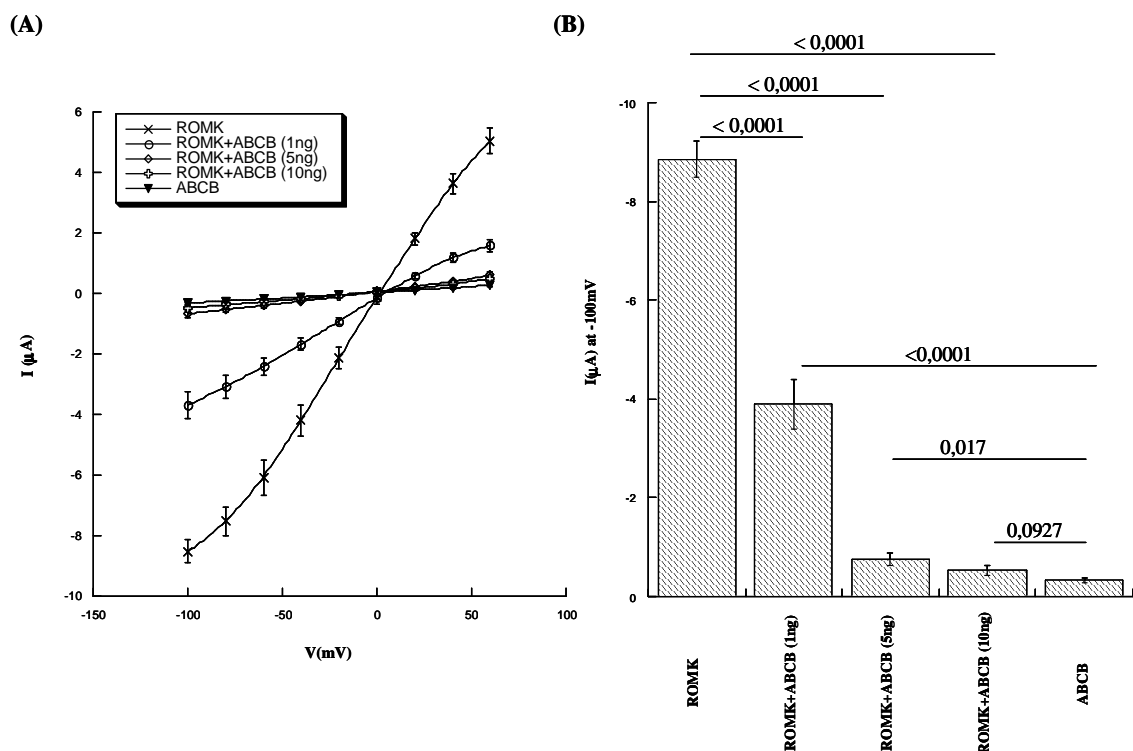
**Abbildung 10: Effekt von Barttin auf ROMK**

Strom-Spannungs-Beziehung (Stromstärke I in  $\mu\text{A}$ , Spannung V in mV) für ROMK und ROMK plus Barttin [A]; gemittelte Ströme I in  $\mu\text{A}$  bei einer Klemmspannung von -100mV für ROMK und ROMK plus Barttin [B]

### 3.5 Effekt verschiedener Konzentrationen des ABCB-Moleküls auf die ROMK-Kanal-Aktivität

Zur Verifizierung eines konzentrationsabhängigen Einflusses von ABCB auf ROMK wurde eine Versuchsreihe mit aufsteigenden ABCB-m-RNA-Konzentrationen durchgeführt (Abbildung 11). Die verwendeten Konstrukte wurden mit jeweils 5pg ROMK-m-RNA pro Oozyte sowie mit 1ng, 5ng und 10ng ABCB-mRNA injiziert.

Im Vergleich von ausschließlich ROMK-exprimierenden Oozyten inhibiert eine Koexpression mit 1ng ABCB die Kanäle im statistischen Mittel zu 56% ( $p < 0,0001$ ). 5ng ABCB inhibieren die Kanäle zu 92% ( $p = 0,017$ ), bei 10ng ABCB kommt es zu einer vollständigen Inhibition (siehe Abbildung 9). Ein signifikanter Unterschied zur Negativ-Kontrolle (ABCB ohne ROMK) besteht hier nicht ( $p = 0,0927$  NS). Die Verringerung der ROMK-bezogenen Ströme durch das Protein ABCB ist hier also von dessen Konzentration abhängig.



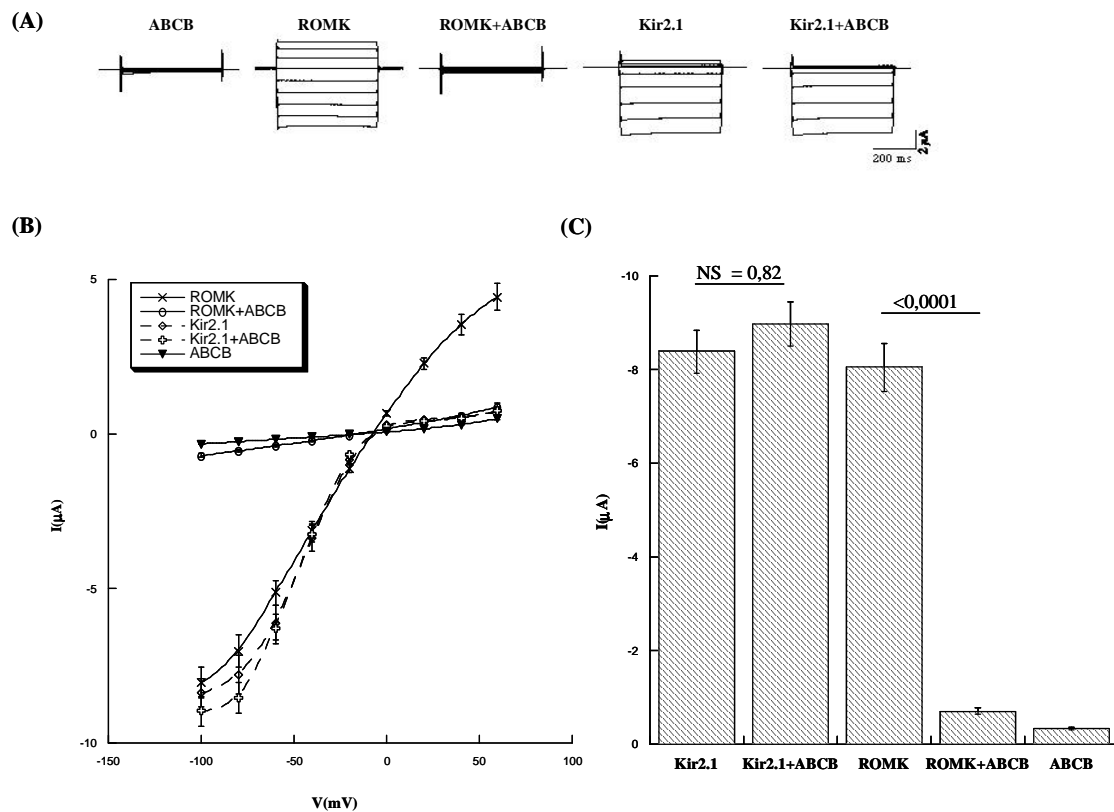
**Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Inhibition der ROMK-Kanäle durch ABCB**

Strom-Spannung-Beziehung für ROMK, ROMK plus 1ng, 5ng, 10ng ABCB und ABCB (Stromstärke  $I$  in  $\mu\text{A}$ , Spannung  $V$  in  $\text{mV}$ ): [A]; gemittelte Ströme  $I$  in  $\mu\text{A}$  bei einer Klemmspannung von  $-100\text{mV}$  für ROMK, ROMK plus 1ng, 5ng, 10ng ABCB und ABCB [B]

### 3.6 Spezifität des Effektes von ABCB auf ROMK

Um die Vermutung zu widerlegen, dass der inhibierende Effekt von ABCB unspezifisch ist und allgemein für einwärts-gleichrichtende Kalium-Kanäle gilt, wurde hier exemplarisch der Effekt von ABCB auf den Kir2.1-Kanal als nahen Verwandten des ROMK-Kanals untersucht.

Ausschließlich Kir2.1-exprimierende Oozyten zeigten ein ähnliches Verhalten wie Oozyten mit ausschließlicher ROMK-Expression. Kir2.1 ist ein stärkerer Einwärtsgleichrichter als ROMK. Somit lässt sich bei positiven Klemmspannungen ein geringerer Einwärtsstrom in die Zelle im Vergleich zu ROMK-Oozyten feststellen (Abbildung 12A/B). Bei Koexpression mit ABCB zeigt der Kir2.1-Kanal im Gegensatz zu ROMK keine Änderung im Aktivitätsprofil (Abbildung 12A-C).



**Abbildung 12: ROMK-spezifischer Effekt des ABCB-Proteins im Vergleich mit dem Kir2.1-Kanal**

Exemplarische Darstellung von Einzelmessergebnissen (ABCB, ROMK, ROMK+ABCB, Kir2.1, Kir2.1+ABCB) [A]; Strom-Spannungs-Beziehung für ROMK, ROMK+ABCB, Kir2.1, Kir2.1+ABCB sowie ABCB (Stromstärke  $I$  in  $\mu$ A, Spannung  $V$  in mV) [B]; gemittelte Ströme  $I$  in  $\mu$ A bei einer Klemmspannung von -100mV für Kir2.1, Kir2.1+ABCB, ROMK, ROMK+ABCB und ABCB [C]

Die gemessenen Ströme bei -100mV Klemmspannung sind für Kir2.1- und Kir2.1+ABCB-exprimierende Oozyten bei im Mittel  $8,38\mu\text{A}$  und  $8,97\mu\text{A}$  nahezu identisch ( $p=0,82$ , Abbildung 12C). Im Gegensatz dazu zeigt eine ROMK+ABCB Koexpression die wie im Abschnitt 3.3 beschriebene Verminderung des Stromflusses ( $p<0,0001$ , Abbildung 12A-C). Der Effekt des ABCB-Proteins kann also in Bezug auf den ROMK-Kanal gezeigt werden, auf den Kir2.1 Kanal zeigt ABCB jedoch keinen Effekt.

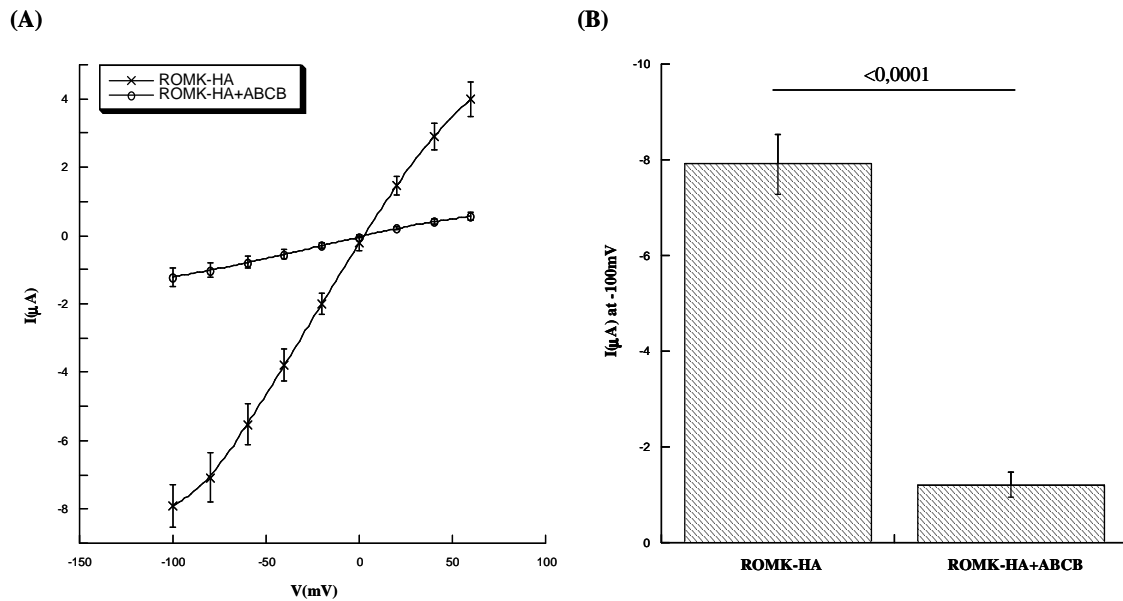
### **3.7 Effekt von ABCB auf Hämagglutinin-markierte ROMK-Kanäle**

Für die Methode der Oberflächenquantifizierung (Abschnitt 3.8) wurde ein leicht modifizierter ROMK-Kanal verwendet. Um ROMK an der Oberfläche der Zelle detektieren zu können wurde in der extrazellulären Schleife des Proteins an der Stelle AS112 ein Hämagglutinin-Epitop (HA-Epitop) eingefügt (Vorarbeit des Labors).

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die Interaktion von ROMK und ABCB durch die HA-Modifikation nicht wesentlich beeinflusst wird, wurde eine Messreihe mit diesen Proteinen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

Für ROMK-HA-exprimierende Zellen kann bei -100mV Klemmspannung ein Strom von im Mittel  $7,91\mu\text{A}$  ermittelt werden. In Kombination mit ABCB werden die Ströme bei -100mV im statistischen Mittel um 85% auf  $1,21\mu\text{A}$  reduziert ( $p<0,0001$ ). Der Verminderung des ROMK-HA-Stroms über die Zellmembran durch ABCB ist demnach mit dem Effekt auf den ROMK-Wildtyp vergleichbar (Vgl. Abbildung 13 mit Abbildung 9).

Trotz der kürzer bemessenen Expressionszeit im Vergleich zu Experimenten mit ROMK-Wildtyp-m-RNA, konnte hier nicht mit der gewünschten Injektionsmenge von 1ng, wie sie auch in den Experimenten zur Oberflächenquantifizierung verwendet wurde, gearbeitet werden, da nach 48h Expressionszeit schon Ströme entstanden, die den Messbereich der TEVC überschritten. Der „Cut off“ für messbare Ströme lag hier bei 250pg ROMK-HA-m-RNA und wurde somit als Injektionsmenge gewählt.



**Abbildung 13: Effekt des ABCB-Proteins auf ROMK-HA**

Strom-Spannungs-Beziehung (Stromstärke  $I$  in  $\mu\text{A}$ , Spannung  $V$  in  $\text{mV}$ ) für ROMK-HA und ROMK-HA plus ABCB [A]; gemittelte Ströme  $I$  in  $\mu\text{A}$  bei einer Klemmspannung von  $-100\text{mV}$  für ROMK-HA und ROMK-HA plus ABCB [B]

### 3.8 Effekt des ABCB-Proteins auf die Oberflächenexpression von ROMK

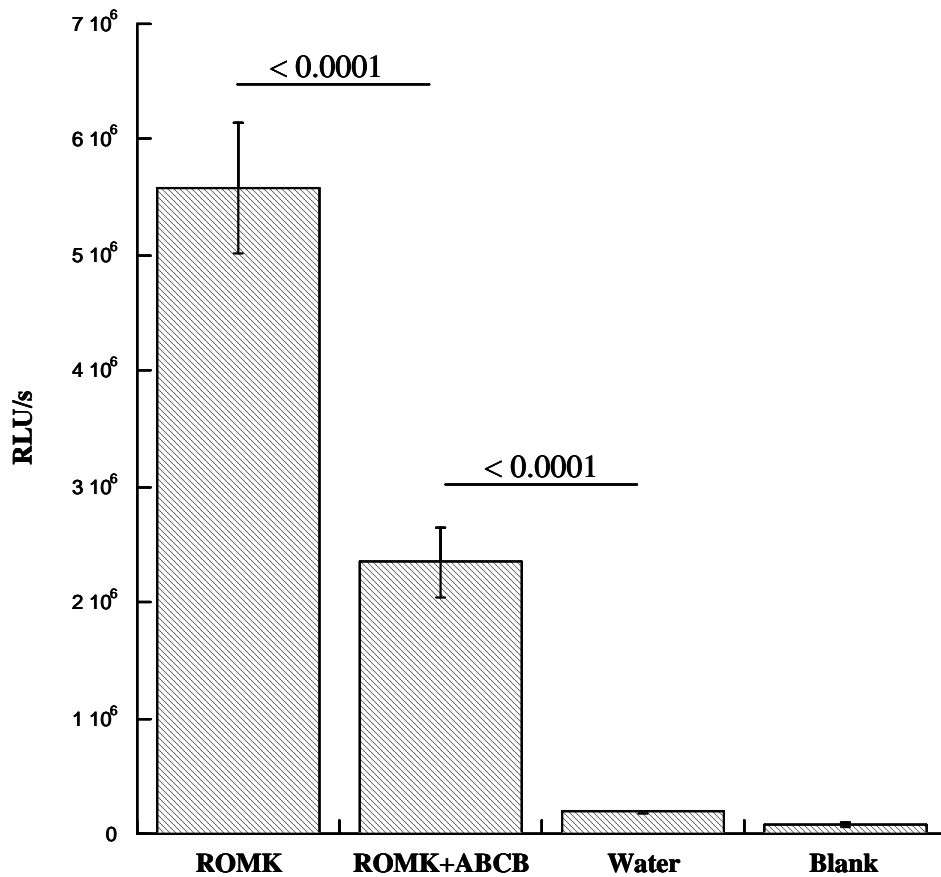
Die Ergebnisse der TEVC-Studien zeigen einen deutlich Effekt von ABCB auf ROMK-Kanalströme im heterologen Expressionssystem. Um diesen Effekt zu spezifizieren wurde eine Oberflächen-Lumineszenzdetektion mit HA-markierten ROMK-Kanalproteinen (ROMK-HA) durchgeführt. Diese Untersuchung erlaubt Aussagen darüber, ob ABCB den ROMK-Kanal direkt in der Membran modifiziert und z.B. einen Einfluss auf das „Gating“ des Kanals ausübt oder ob der Transport zur Zellmembran durch ABCB behindert wird und die Minderung der ROMK-Ströme durch ein Nicht-Erreichen der Zellmembran entsteht („Trafficking-Effekt“).

Ein direkter Einfluss von ABCB auf die ROMK-Expression durch Interferenz auf mRNA-Ebene oder eine anders geartete Störung der Expression ist eher unwahrscheinlich. In der Western-Blot Analyse (Abbildung 14B) zeigen sowohl die Proteinextraktion von ROMK-HA injizierten Oozyten als auch die Extraktion von ROMK-HA+ABCB injizierten Zellen eine kräftige Bande bei  $\sim 45 \text{ kDa}$ . Dies entspricht der Größe von ROMK-Monomeren (Xu et al. 1997).

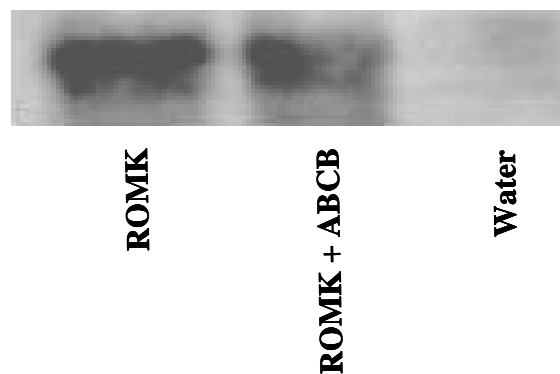
In der Oberflächen-Lumineszenzdetektion zeigen ROMK-HA+ABCB koexprimierende Oozyten im Mittel eine 58%ige Abschwächung des Signals verglichen mit ROMK-HA-

exprimierenden Zellen ( $p < 0,0001$ ; Abbildung 14A). In Anwesenheit von ABCB lassen sich also wesentlich geringere Mengen an ROMK-Kanalprotein in der Zellmembran nachweisen.

**(A)**



**(B)**



**Abbildung 14: Effekt von ABCB auf die ROMK-Oberflächenexpression**

Oberflächen-Lumineszenzdetektion: gemittelte Signalstärke in RLU/s der Konstrukte ROMK-HA, ROMK-HA plus ABCB, sowie von Wasser injizierten Oozyten und dem Leerwert (Blank) (A), Westernblot-Analyse: ROMK-HA, ROMK-HA plus ABCB sowie Wasser-injizierte Zellen (B). Cave: In dieser Abbildung bezieht sich die Bezeichnung „ROMK“ auf ausschließlich Hämagglutinin markiertes Protein (ROMK-HA)



### 3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Im heterologen Expressionssystem vermindert die Koexpression von ABCB die ROMK-Ströme über die Zellmembran.
- Eine Koexpression von Barttin hingegen hat keinen signifikanten Einfluss auf die ROMK-Ströme über die Zellmembran.
- Die Ausprägung des Effektes von ABCB auf ROMK ist konzentrationsabhängig.
- Der nachgewiesene Effekt von ABCB auf die Kanalströme lässt sich nicht bei dem nahen Verwandten Kir2.1 beobachten.
- Der Effekt von ABCB auf ROMK-HA besitzt den gleichen Charakter wie der ABCB-Effekt auf ROMK ohne HA-Epitop.
- Die ROMK-Expression wird nicht durch die Anwesenheit bzw. gleichzeitige Expression von ABCB vermindert.
- In Anwesenheit von ABCB lassen sich wesentlich geringere Mengen an ROMK-Kanalprotein in der Zellmembran nachweisen.

## 4 Diskussion

Hereditäre Salzverlusttubulopathien sind eine Gruppe heterogener Erkrankungen, deren genetische Ursache bisher nur unvollständig geklärt werden konnte. Der ROMK-Kalium-Kanal in der Niere katalysiert einen wichtigen Schritt bei der Salzresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife. Auf der Suche nach neuen Kandidatenproteinen, deren Störung zu renalem Salzverlust führt sind ROMK-interagierende Proteine daher von besonderem Interesse. Mit Hilfe der Yeast-Two-Hybrid (Y2H) Technologie konnten wir in vorangegangenen Versuchen eine Interaktion von ROMK mit ABCB1 feststellen. Die Aufgabe dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung einer physiologischen Interaktion dieser beiden Proteine. Wir konnten zeigen, dass ABCB1 in einer spezifischen Weise mit ROMK interagiert. In unseren Versuchen im heterologen Expressionssystem von *Xenopus laevis* Oozyten hemmt ABCB1 konzentrationsabhängig den Kaliumkanal vermutlich durch eine Störung dessen Traffickings zur Zellmembran.

### 4.1 Methodendiskussion

#### 4.1.1 *Xenopus laevis* Oozyten als heterologes Expressionssystem

Gurdon et al. veröffentlichten 1971 erstmals molekularbiologische Studien an Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Darin wurde demonstriert, dass *Xenopus* Oozyten in der Lage sind Hämoglobin zu synthetisieren, wenn ihnen die entsprechende m-RNA injiziert wird (Gurdon et al. 1971). Erste Expressionstudien mit dem ROMK-Kaliumkanal wurden von Boim et al. 1995 publiziert (Boim et al. 1995). Das in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersuchte Protein ABCB wurde erstmals 1990 in *Xenopus* Oozyten exprimiert (Castillo et al. 1990).

Ein besonderer Vorteil von *Xenopus laevis* Oozyten liegt in ihrer Größe. Mit ca 5 $\mu$ l Verteilungsvolumen und 1,1 bis 1,3mm Durchmesser sind sie sowohl als einzelne Zellen visuell gut zu beurteilen als auch leicht zu manipulieren. Da sie normalerweise in einem ungeschützten Umfeld abgelegt werden, sind sie besonders robust und mit allen notwendigen Substraten für Wachstum und effiziente Proteintranslation ausgestattet (Wagner et al. 2000). Sie eignen sich hervorragend zur Mikroinjektion von (Fremd-) Proteinen oder m-RNA in die Zelle. Sie können sogar zur in vivo Transkription und Replikation von heterogener DNA verwendet werden.

Ein weiterer Vorteil besteht in der hohen translationalen Kapazität der Oozyten, die durch eine große Anzahl von freien Ribosomen im Zytoplasma bedingt ist. Diese Eigenschaft ist vor allem bei der Expression heterologer Proteine von großem Wert. Durch ihre relative Unabhängigkeit gegenüber der Notwendigkeit von Substrataufnahme aus der Umwelt, exprimieren *Xenopus* Oozyten nur eine geringe Menge an Membrantransportsystemen, was eine Störung von heterolog exprimierten Membranproteinen oder Transportern gering hält (Wagner et al. 2000). Das Verhältnis von heterologer zu endogener Proteintranslation ist relativ hoch.

Das Expressionssystem *Xenopus laevis* Oozyten ermöglicht damit eine effiziente Analyse von humanen Genprodukten, Isoformen und Mutanten membranständiger Proteine, wobei unterschiedlichste Methoden zum Einsatz gebracht werden. Dazu gehören elektrophysiologische Methoden wie die TEVC-Methode, Patch Clamp Techniken zur Einzelkanal-Analyse, Messungen mit Ionen-selektiven Elektroden oder gepaarte TEVC-Messungen z.B. zur Bestimmung von Connexin-Funktionen, sowie Tracer-Flux Methoden, Western Blots, Immunhistochemische Methoden und Oberflächen-Lumineszenzdetektion.

Ergebnisse aus heterologen Proteinexpressionsstudien müssen trotzdem mit Vorsicht interpretiert werden. Eine mögliche Limitation in Bezug auf die Expression von humanen Membranproteinen in *Xenopus laevis* Oozyten liegt in der Tatsache, dass es sich hier um ein amphibisches Zellsystem handelt. Auch wenn dies nur relativ selten auftritt, können die heterologen Proteine mit Proteinen endogener Herkunft interagieren, wobei Störungen durch endogene Proteinfunktion auftreten können (Wagner et al. 2000). Dadurch entstehen möglicherweise deutliche Differenzen zur *in vivo* Situation.

Ein Beispiel für eine solche Interaktion ist der sogenannte IKs-Kanal. In *Xenopus*-Oozyten kommt es zu einer besonderen Formation dieses heteromultimeren Kaliumkanals. Der IKs besteht aus zwei Typen von Untereinheiten: KCNE1 (oder MinK) und KCNQ1 (auch KvLQT1). Wenn KCNE1 alleine in *Xenopus* Oozyten exprimiert wird, werden IKs Kanäle induziert. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass KCNE1 allein den IKs Kanal bildet (Hausdorff et al. 1991). Die Klonierung des KCNQ1 zeigte jedoch, dass sich der IKs Kanal aus dem exogen exprimierten KCNE1 und der endogenen *Xenopus* KCNQ1 Isoform (xKCNQ1) zusammensetzt (Sanguinetti et al. 1996).

Weiterhin ist zu beachten, dass die Umgebung der Zellmembran von Frosch-Oozyten klar vom Prototyp der Mammaliae abweicht. Zudem finden sich hier oozytenspezifische

Signaltransduktionswege und eine ebenfalls spezifische intrazelluläre Trafficking Regulation (Keller K & Olsowski A 1999).

Ein weiterer Nachteil dieses Zellsystems ergibt sich aus den jahreszeitlichen Schwankungen in der „Qualität“ der Oozyten. Hierbei handelt es sich um ein verbreitetes Phänomen, das von vielen Arbeitsgruppen beschrieben, aber bis heute noch nicht systematisch untersucht wurde. Die Qualitätsschwankungen äußern sich in einer abnehmenden Expressionsrate von heterogenen Proteinen und einer Verringerung der Endozytose von Nährsubstanzen. Die Lebensfähigkeit der Oozyten kann sich auf 1 bis 2 Tage, verbunden mit drastischen morphologischen Veränderungen, reduzieren (Hilken et al. 1997). Auch die Oozyten, die für die Experimentreihen dieser Arbeit verwendet wurden, unterlagen Qualitätsschwankungen. Deshalb musste für eine statistisch abgesicherte Untersuchung ein hoher experimenteller Aufwand betrieben werden.

Bei der Arbeit mit heterolog exprimierten Ionenkanälen ist folgendes zu beachten: Ströme durch endogen exprimierte Kanäle in *Xenopus* können unter Umständen die Analyse exogen exprimierter Kanäle in der TEVC erschweren. So kommt es z.B. bei positiven Klemmspannungen ab +60mV zur Aktivierung von endogenen Chloridkanälen, die mit der Messung von ROMK-Strömen interferieren (Waldegger S, persönliche Mitteilung). U.a. aus diesem Grund beschränkten sich unsere Spannungsprotokolle auf Werte zwischen -100mV und +60mV.

Im Gegensatz dazu können *Xenopus*-Ionen-Kanäle aber auch als wertvolle Werkzeuge benutzt werden, um die Eigenschaften exogener Membranproteine zu entschlüsseln. Der endogene,  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Chloridstrom kann dazu instrumentalisiert werden, wie z.B. bei der Expression des ionotropen Glutamat-Rezeptors iGluR3 gezeigt wurde (Kuruma & Hartzell 1999).

#### **4.1.2 pSGEM Subklone und m-RNA Synthese**

Für die Herstellung der messenger RNA der Proteine ROMK, ABCB und ROMK-HA wurde deren c-DNA für diese Arbeit in das Vektorplasmid pSGEM subkloniert. pSGEM ist ein sogenannter Oozyten-Expressionsvektor. Er enthält eine 5' und 3' untranslatierte Region mit dem Xenopus  $\beta$ -Globin, welches die „multiple cloning site“ flankiert. Weiterhin enthält er eine zusätzliche Restriktionsstelle am 3' Ende der Poly(A) Sequenz. Die Xenopus  $\beta$ -Globin Sequenz wird sehr gut in den Oozyten exprimiert. Die Nutzung von Vektoren mit diesen Eigenschaften erhöht dadurch zuverlässig die Expression in den Oozyten (Wagner et al. 2000).

Ein weiterer Faktor, der die Translation injizierter m-RNA in den Oozyten begünstigt, ist das „Capping“ der m-RNA durch Einsatz des  $m^7G(5')ppp(5')G$  Cap-Analogons. Diese Cap-Struktur am 5' Ende der m-RNA der verwendeten Proteine führt zu einer erhöhten Stabilität und damit zu einer effektiveren Translation.

Die m-RNA ist sehr anfällig gegenüber fast ubiquitär vorkommenden RNAsen. Insbesondere große RNA-Moleküle wie ABCB sind deswegen von Degradierung bedroht. Ergebnisse können dadurch empfindlich beeinträchtigt werden, indem z.B. der Effekt von ABCB auf ROMK durch Degradierung eines Großteils der m-RNA als falsch gering eingeschätzt würde. Um diese Gefahr zu minimieren wurde die Integrität der m-RNA vor Injektion in der Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

Oozyten können Proteine exprimieren, die mit der Analyse von exogen exprimiertem Protein interferieren können. Es gibt die Möglichkeit sogenannte antisense Oligonukleotide in die Zelle zu injizieren, um die Expression von bekannten endogenen Proteinen zu unterdrücken. In unseren Experimenten wurde davon jedoch kein Gebrauch gemacht, da Oligonukleotide auch die Expression von anderen Proteinen unspezifisch verändern können. Die Gefahr hätte speziell für die ABCB Expression bestanden, da dies insbesondere für Proteine von großer molekularer Masse gilt (Wagner et al. 2000).

### 4.1.3 Die TEVC-Methode

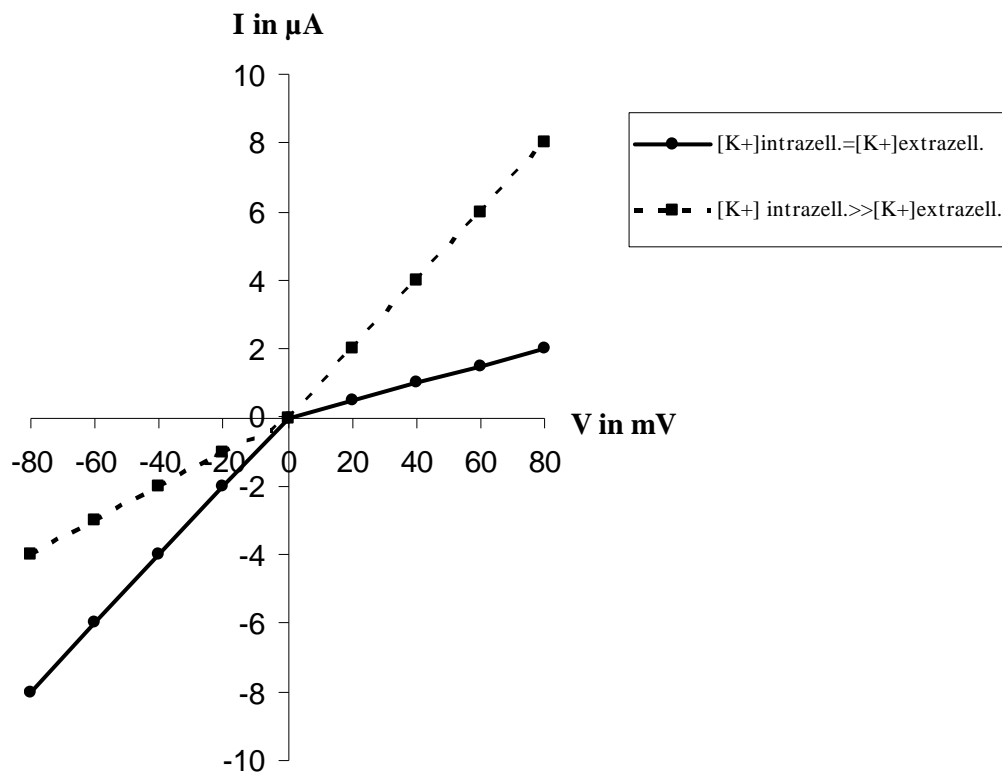
Die TEVC-Methode ist die meist verwendete elektrophysiologische Technik zur Messung von Ganz-Zell-Strömen durch Ionenkanäle oder elektrogene Transporter bei Expression in *Xenopus* Oozyten. Eine weitere Methode zur Bestimmung von Transportprozessen in *Xenopus* Oocyten ist die sogenannte Tracer-Flux-Methode. Sie ist im Vergleich zur elektrophysiologischen Methode weitaus sensitiver. In Oozyten können elektrophysiologisch Ströme ab 5nA mit hinreichender Genauigkeit gemessen werden. Ein Strom von 5nA entspricht einem Flux von 180pmol an Ladung/h, eine Größe die sehr leicht mit radioaktiv markierten Substraten detektiert werden kann (Wagner et al. 2000). Allerdings ist die Tracer Flux Methode sehr aufwendig und vor allem für die Untersuchung des Transports kleiner Moleküle wie z.B. Glucose geeignet. Im Gegensatz dazu ist die TEVC-Methode eine relativ einfache Messmethode für elektrogene Transportprozesse, mit der Strom-Spannungsbeziehungen sehr gut dargestellt werden können.

In dieser Arbeit werden vor allem Kalium-Ionenströme beschrieben. Für Transportmessungen durch die TEVC ist es im Gegensatz zur Tracer-Flux-Methode von Bedeutung, dass die Substratkonzentration (in diesem Fall  $[K^+]$ ) relativ hoch ist und weit über dem  $K_m$ -Wert des Transporters (ROMK) liegt. Dies ist durch die natürliche intrazellulär hohe Kaliumkonzentration wie auch durch die extrazelluläre Messlösung KD96 gegeben.

Die Versuchsanordnung mit extrazellulär wie intrazellulär äquimolarer Kaliumkonzentration mag auf den ersten Blick überraschend erscheinen, da solch eine Ionenverteilung unphysiologisch ist. Die hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration wurde hier allerdings ganz bewusst gewählt, um Ströme zu erhalten, die das charakteristische Bild eines ROMK-Kanals zeigen mit dem ihm eigenen Identifikationsmerkmal einer schwachen Einwärtsgleichrichtung (Zhou et al. 1994). Bei Versuchen mit einer physiologischen Ionenverteilung - also mit extrazellulär niedriger Kaliumkonzentration - würde der dadurch hervorgerufene starke elektrochemische Gradient die Einwärtsgleichrichtung komplett konterkarieren. Damit wäre die Identifizierung der Ströme als ROMK-generiert wesentlich erschwert. ROMK-Ströme könnten somit z.B. als Leckströme fehlinterpretiert werden. Außerdem wäre ein möglicher Einfluss von ABCB auf die Einwärtsgleichrichtung des Kanals wesentlich schwerer zu beurteilen. Zur Veranschaulichung des Verhaltens von einwärts-

gleichrichtenden Kaliumkanälen bei unterschiedlichen extrazellulären  $K^+$ -Konzentrationen (siehe Abbildung 15).

Auf der einen Seite bilden die hier beschriebenen in vitro Bedingungen nicht exakt die reale Situation in der menschlichen Niere nach, so dass direkte Rückschlüsse vom Oozytenexpressionssystem auf den menschlichen Organismus mit genügender Vorsicht zu betrachten sind. Auf der anderen Seite lässt sich mittels der TEVC-Methode eine Interaktion auf molekularer Ebene zwischen Membranprotein und Ionenkanal in Xenopus-Oozyten auf eine besonders einfache Art und Weise veranschaulichen.



**Abbildung 15: Schema der Strom-Spannungs-Beziehung eines  $K^+$ -Einwärtsgleichrichters (z.B. ROMK)**

Verhalten von Stromstärke (I) in  $\mu A$  in Abhängigkeit von der Spannung (V) in mV bei unterschiedlichen extra- und intrazellulären  $[K^+]$ -Konzentrationen

#### ***4.1.4 Oberflächen-Lumineszenzdetektion und Western Blot***

Für die Oberflächenlumineszenzdetektion von ROMK an *Xenopus* Oozyten wurde ein Hämagglutinin (HA-) Epitop in das Protein eingefügt. Dadurch ist es möglich die Menge an ROMK-Kanal-Protein in der Plasmamembran akkurat per Antikörper-Detektion zu quantifizieren. Es besteht allerdings die Gefahr, dass durch die HA-Modifikation die Funktionen und Interaktionsmöglichkeiten des Proteins verändert werden. So lassen sich für ROMK-HA in der TEVC-Messung abgeschwächte Ströme gegenüber den ROMK-Wildtyp-Strömen feststellen. Allerdings bleibt die ROMK-Charakteristik einer schwachen Einwärtsgleichrichtung erhalten. Eine Möglichkeit, die Modifikation des Proteins zu umgehen, wäre mit biotinylierten spezifischen Antikörpern zu arbeiten. Da eine Biotinylierung der Antikörper aber nicht regionspezifisch stattfindet, nimmt die Sensitivität der Antikörper durch sterische Hemmung stark ab. Es muss somit viel Protein vorhanden sein, um einen Nachweis überhaupt führen zu können. Es bestünde also die Gefahr, dass vorhandenes ROMK-Kanalprotein gar nicht detektiert würde. Außerdem sollen bei der Oberflächenquantifizierung nur die tatsächlich in der Membran lokalisierten Kanäle detektiert werden. Man bräuchte also einen Antikörper, der nur die extrazelluläre Domäne von ROMK bindet. Diese Antikörper müssten erst in sehr aufwendiger Weise hergestellt werden und standen für unsere Experimente nicht zur Verfügung.

Der HA-Essay stellt hier eine elegante und kostengünstige Möglichkeit dar, den Einsatz von spezifischen ROMK-Antikörpern zu umgehen. Durch das extrazellulär eingefügte HA-Epitop wird gesichert, dass nur die ROMK-Proteine detektiert werden, welche in der Zellmembran inserieren.

Ein weiterer großer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass alle Untersuchungen auf einfache Art und Weise an der lebenden Zelle durchgeführt werden können. Wohingegen bei alternativen Methoden zur Oberflächenquantifizierung von Membranproteinen die Oozyten aufwändig präpariert und geschnitten werden müssen. Eine alternative Möglichkeit besteht hier z.B in einer Fixierung mit Paraformaldehyd mit nachfolgendem Einfrieren in Flüssig-Propan und Schneiden im Kryostat mit anschließender Antikörperdetektion. Bei einer ähnlichen Methode werden die Oozyten durch Dent's Fixanz fixiert und permeabilisiert. Die Antikörper-Bindung findet dann vor Einbettung in Acrylamid statt. Hier werden die Oozyten erst nachfolgend im Mikrotom geschnitten (Wagner et al. 2000). Beide genannten Methoden können jedoch nicht an lebenden Zellen durchgeführt werden.



**Western Blot:**

Western Blotting ist eine Standardtechnik zum Nachweis von Proteinen. Zur Detektion von Membranproteinen, die aus der Zellmembran von *Xenopus laevis* Oozyten gewonnen werden, ist es von besonderer Bedeutung, bei der Präparation den Eidotter sorgfältig zu entfernen, da dieser sonst die Elektrophorese und die Antikörperbindung empfindlich stören kann.

In dieser Arbeit wurden Western Blots nur in sehr geringem Umfang zur Detektion von ROMK-HA durchgeführt. Trotzdem sollen hier einige weitere mögliche Einflussfaktoren auf Resultate dieser Methode diskutiert werden.

ROMK-HA zeigte sich jeweils als sehr kräftige Bande bzw. als mehrere dicht beieinander liegende Banden. Eine intensive Bande entsteht durch eine hohe Konzentration Antikörper-bindenden Proteins in einem definierten Bereich des Blots. Eine Aufhellung in nur einem Teilbereich einer spezifischen Bande kann auf kleine Luftblasen bei unsachgemäßem Einschlagen des Blotpapiers in Folie zurückzuführen sein. Schwankungen in der Laufgeldichte und der Stromstärke während der Elektrophorese sind mögliche Ursachen für eine mangelnde Aufspaltung der Bande. Leicht unterschiedliche Intensitäten der Banden sind womöglich darauf zurückzuführen, dass keine definierten Proteinmengen gegeneinander aufgetragen wurden.

Unterschiedliche Glykolisierungs-Zustände können Ursache von multiplen, eng aneinander liegenden Proteinbanden sein.

Diese Art der Bandendifferenzierung wurde auch für den Wild-Typ CFTR beschrieben, bei dem sich im Western Blot die Banden der unterschiedlichen Glykosilierungszustände (unglykosiliert; Glykosilierung im ER; vollständig glykosiliertes Protein, hergestellt im Golgi-Apparat) getrennt voneinander nachweisen ließen (Rubenstein et al. 1997).

Unspezifische Banden können durch zu geringe Spezifität des anti-HA-Antikörpers von Roche bedingt sein. Leider war es uns nicht möglich, einen AK zu finden, der eine höhere Spezifität bieten kann.

Ganz reine ROMK-Banden, wie sie mit dem ROMK-Antikörper von Alamone Laboratories, Jerusalem, Israel gezeigt wurden (Lin et al. 2002) ließen sich bei uns mit keinem Antikörper darstellen.

## 4.2 Ergebnisdiskussion

### 4.2.1 *Physiologische Interaktion von ROMK-Kanalprotein mit dem ABCB1-Molekül im heterologen Expressionssystem*

Die Expression von Proteinen im heterologen System der *Xenopus laevis* Oozyten ist eine gängige Methode zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen. Insbesondere die TEVC-Methode eröffnet wie unter 4.1.3 beschrieben den Einblick in physiologische Konsequenzen der Interaktion von Kanalproteinen und akzessorischen Molekülen.

Seit mehreren Jahren wird in unterschiedlichen Arbeitsgruppen nach einer  $\beta$ -Untereinheit für den ROMK-Kaliumkanal gesucht, welche zusammen mit dem ROMK-Kanalprotein den 70pS intermediate-conductance Kanal in der TAL bilden könnte. Es gibt Indizien dafür, dass ABCB hier als Kandidatenprotein in Frage kommt. Demnach erhofften wir, in den hier gezeigten Experimenten mit der TEVC eine Erhöhung des ROMK-Stromflusses bei Koexpression mit ABCB1 in *Xenopus* Oozyten feststellen zu können.

Unsere Ergebnisse zeigen jedoch einen genau gegenteiligen Effekt. Danach vermindert die Koexpression der beiden Proteine die ROMK-Kanalströme in den *Xenopus* Oozyten massiv. Es stellt sich die Frage, ob dieser Effekt expressionsbedingt sein kann und gar nicht auf eine Protein-Protein-Interaktion zurückzuführen ist. Interferenzen könnten z.B. durch Konkurrenz an den Ribosomen oder aber durch RNA-RNA-Interaktion entstehen. Insbesondere dadurch, dass in den Versuchen nicht mit äquimolaren Mengen an m-RNA gearbeitet wurde, sondern jeweils 10 ng ABCB mit 5pg ROMK-m-RNA pro Oozyte injiziert wurden, müssen solche Einflüsse in Betracht gezogen werden. Dies gilt in gleichem Maße für die Experimente, in denen eine konzentrationsabhängige Hemmung der ROMK-Ströme durch die Injektion von 1ng, 5ng und 10 ng ABCB m-RNA gezeigt wurde (siehe 3.5).

Um möglichen generell expressionsbedingten Impact auf ROMK rechtzeitig zu entdecken, wurden Koexpressionen mit 5pg ROMK-m-RNA und 10ng Barttin-m-RNA durchgeführt. Barttin ist eine regulatorische Untereinheit spezieller Chloridkanäle in Tubuluszellen der TAL und des DCT (Estevez et al. 2001). Barttin zeigte in diesen Experimenten keinen Effekt auf den ROMK-Kanal, wobei Barttin hier in ABCB-äquivalenter Menge injiziert wurde. Diese Daten zeigen, dass eine generelle

Verminderung der ROMK-Expression durch hohe m-RNA-Injektionsmengen eines weiteren Proteins unwahrscheinlich ist.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass der ABCB-Effekt auf unspezifischer Protein-Protein-Interaktion beruht. Aus diesem Grund führten wir das Kontrollexperiment mit dem engen Verwandten des ROMK-Kanals Kir2.1 durch.

Die Tatsache, dass in dieser Versuchsreihe ABCB keinen Effekt auf den ROMK-verwandten Kir2.1-Kanal zeigte (siehe unter 3.6), deutet einmal mehr darauf hin, dass hier keine entscheidende Interferenz aufgrund von einer Expressionsimbalance besteht. Zusätzlich wird deutlich, dass der Effekt von ABCB für ROMK spezifisch ist. Dies unterstreicht noch einmal, dass es sich bei ABCB tatsächlich um ein physiologisch mit ROMK interagierendes Protein handeln könnte.

Die Injektion in unterschiedlichen Mengenverhältnissen (ROMK 5pg mit ABCB 10ng) ist nur bedingt auf die Größenunterschiede der Proteine ROMK (~45kDa) und ABCB1 (~170kDa) zurückzuführen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Korrelation zwischen m-RNA-Level und funktionaler ABCB-Expression relativ schwach ist. Außerdem wird die Expression als hoch variabel unter verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Bedingungen beschrieben (Sarkadi et al. 2006). Dies mag einer mangelnden m-RNA-Stabilität und geringer Translationsinitiation geschuldet sein, wie z.B. in leukämischen Zelllinien demonstriert wurde (Yague et al. 2003). Im Gegensatz dazu kann für ROMK eine sehr gute und stabile Expression in *Xenopus* Oozyten beobachtet werden. Hier unterstützen die endogen hohen PKA Level der Oozyten zusätzlich die ohnehin konstitutiv hohe ROMK-Aktivität (Yoo et al. 2003). Bei ROMK-Injektionsmengen über 5-10 pg/ Oozyte werden nach 2-4 Tagen Expressionszeit die Ganzzellströme so hoch, dass der Messbereich der TEVC überschritten wird.

Es bestehen also massive Unterschiede zwischen ROMK und ABCB hinsichtlich ihrer Expressionsstärke in den Oozyten, was die Injektionen von m-RNA in unterschiedlichen molaren Verhältnissen begründet, welche hier für den Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion notwendig sind.

Entgegen der Annahme eines expressionsbedingten Effektes, gehen wir also davon aus, dass der Effekt einer Koexpression von ABCB auf die ROMK-generierten Zellströme durch funktionelle Kopplung der beiden Partner bedingt ist. Diese physiologische Kopplung führt im heterologen System zwar nicht - wie erwartet - zu einer erhöhten ROMK-Funktion, liefert aber dennoch ein starkes Indiz dafür, dass ABCB ein ROMK-interagierendes Protein darstellt.

#### ***4.2.2 Effekt des ABCB-Proteins auf die Membrandichte von ROMK in der Oberflächen-Lumineszenzdetektion***

In den TEVC-Experimenten konnten wir zeigen, dass ROMK und ABCB funktionell interagieren, wobei ABCB die ROMK-Ströme über die Zellmembran massiv inhibiert. Mit Hilfe des HA-Essays zur Oberflächenquantifizierung sollte ein zu überprüfender Gating- von einem ebenfalls möglichen Trafficking-Effekt abgegrenzt werden.

Die etwaigen Verzerrungen durch das eingefügte HA-Epitop im ROMK-Kanal wurden unter 4.1.4 diskutiert. Um eine ausreichende Proteinmenge zur Detektion an der Membranoberfläche zu erhalten, musste für den HA-Essay 1ng ROMK-HA pro Oozyte injiziert werden. In der TEVC wird bei solch hohen Injektionsmengen der Messbereich schon nach 1-2 Tagen Expressionszeit weit überschritten. Aus diesem Grund mussten wir für den Nachweis, dass sich HA-getaggtetes ROMK-Kanalprotein in hoher Konzentration in der Koexpression mit 10ng ABCB pro Oozyte ähnlich verhält wie der Wildtyp-ROMK in niedriger Konzentration, 250pg ROMK statt 1ng ROMK injizieren und schon nach 48h Expressionszeit Messungen durchführen (siehe 3.7).

Die Oberflächenexpression von ROMK ist in Anwesenheit von ABCB zu ca. 60% vermindert gegenüber einer ROMK-Expression ohne ABCB. Im Vergleich zur TEVC-Messung ist der ABCB-Effekt zwar auch deutlich aber nicht so massiv ausgeprägt. Ursache kann hier die höhere m-RNA-Injektionsmenge (1ng) für den HA-Essay sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich um einen ABCB-generierten kombinierten Trafficking und Gating-Effekt handelt, der selbstverständlich in der TEVC-Messung stärkeren Ausdruck findet als in der Oberflächen-Lumineszenzdetektion. Um dieses genauer zu spezifizieren, müssten nachfolgend Einzelkanalmessungen durchgeführt werden.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ROMK und ABCB in der Plasmamembran eine funktionelle heteromultimere Kanaleinheit bilden. Unsere Experimente zeigen zwar eine Hemmung der Gesamt-Kanalaktivität durch Minderung der Oberflächenexpression im heterologen System, sie müssen jedoch hinsichtlich der Unterschiede zwischen in vivo- und in vitro-Bedingungen differenziert betrachtet werden. So können mit der angewendeten TEVC-Methode nur Ganzzellströme beurteilt werden. Über die Aktivität oder Modulation von Einzelkanalaktivitäten können hier keine Aussagen getroffen werden. Patch-Clamp-Untersuchungen könnten auch hier näheren Aufschluss geben.

### **4.3 Mögliche Konsequenzen aus der gezeigten Interaktion von ROMK und ABCB1**

#### ***4.3.1 ROMK-ABCB-Interaktion im physiologischen Kontext***

In den letzten Jahren wurde mehr und mehr deutlich, dass Proteine nicht alleine agieren sondern sich vielmehr in Komplexen dauerhaft oder vorübergehend vernetzen. Dabei können einzelne Proteine Teil von unterschiedlichen Komplexen sein und dadurch auch verschiedene Funktionen übernehmen (Abbott 2002).

Kaliumkanäle werden durch eine Vielzahl verschiedener Proteine in ihren biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften moduliert. Es kommt zu postrationalen Modifikationen auf dem Transport entlang des sekretorischen Weges von der Biogenese am endoplasmatischen Retikulum über den Golgi Apparat bis zu Zelloberfläche. Dabei entstehen unter anderem heteromultimere Proteinkomplexe aus Kanalproteinen und  $\beta$ -Untereinheiten sowie weiteren assoziierenden Molekülen. So ist auch das ROMK-Kanalprotein wahrscheinlich Teil eines Multiproteinkomplexes und wird durch verschiedenste interagierende Moleküle modifiziert, transportiert oder retiniert. Diese sind allerdings bisher nur zum Teil bekannt bzw. noch Gegenstand aktueller Forschung.

In vorausgegangenen Studien wurde gezeigt, dass ROMK für die Expression des 70pS-Kaliumkanals in der TAL notwendig ist (Lu et al. 2004). Die Frage, ob sich der 70pS Kanal aus dem 35pS-low-conductance-Kanal und einer akzessorischen Untereinheit zusammensetzt, wird viel diskutiert, konnte aber bisher nicht abschließend beantwortet werden. Insbesondere Resultaten auf der Suche nach einer Untereinheit fehlt bisher hinreichende Evidenz.

Die ATP-Cassette-Binding Proteine CFTR und SUR1 sowie SUR2B wurden als mögliche Interaktionspartner des 35pS-ROMK-Kanals untersucht (Ruknudin et al. 1998; Tanemoto et al. 2000; Dong et al. 2001; Lu et al. 2006). Für SUR2B wie CFTR wird dabei eine glibenclamidabhängige Hemmung, in Analogie zur SUR1 vermittelten Kir6.2 Inhibition in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle, als Indiz für eine ROMK/SUR2B-Interaktion (Tanemoto et al. 2000) bzw. eine CFTR-ROMK-Interaktion (Lu et al. 2006; McNicholas et al. 1996a; Ruknudin et al. 1998) herangezogen. Dies wurde allerdings zumindest für den SUR2B von Konstas als fraglich eingestuft (Konstas et al. 2002a). Konstas verweist in einer weiteren Arbeit auf den CFTR als möglichen Interaktionspartner von ROMK, da er zumindest in Coexpression in *Xenopus* Oozyten

mit dem renalen aldosteronsensitiven ENaC-Kanal und ROMK die ROMK-Ströme deutlich erhöht (Konstas et al. 2002b). Allerdings wird der ENaC nur im CCD des Nephrons exprimiert und nicht in der TAL oder im DCT, wo der ROMK-Kanal seine Hauptwirkung entfaltet. Außerdem ist es unwahrscheinlich, wie schon unter 1.4.3 beschrieben, dass der CFTR beim Menschen eine entscheidende Funktion in der renalen Salz- und Wasserresorption einnimmt, da bei Patienten mit Cystischer Fibrose bisher kein ausgeprägter renaler Phänotyp beschrieben wurde. Die Kandidatenfrage hinsichtlich einer akzessorischen Untereinheit des renalen 70pS K<sup>+</sup>-ATP-Kanals bleibt also weiterhin ungeklärt.

Aufgrund der phänotypischen Homologien zwischen ROMK- und ABCB1-Knockoutmäusen (Lorenz et al. 2002; Huls et al. 2007) und des Aufdeckens von Protein-Protein Interaktion im Yeast-two-Hybrid-Screening stellten wir die Hypothese auf, dass ROMK mit ABCB1 als akzessorischer Untereinheit den renalen 70pS ATP-Kanal bildet oder zumindest dessen Funktion entscheidend beeinflusst.

Unsere Ergebnisse weisen eine starke Interaktion zwischen ABCB und dem ROMK-Kanalprotein nach. Im heterologen System der *Xenopus*-Oozyten konnten wir zeigen, dass ABCB vermutlich die ROMK-Proteine in ihrem Trafficking zur Zellmembran stört. Hinsichtlich der Suche nach ROMK-interagierenden Kandidatengen sind Wechselwirkungen im Trafficking-Prozess von besonderer Bedeutung und bedürfen einer genaueren Evaluation. Peters et al. verwiesen 2003 darauf, dass in einem Pool natürlich auftretender ROMK-Mutationen, die ursächlich für ein aBS/HPS sind, 14 von 20 Mutationen einen Trafficking-Defekt im ROMK-Protein hervorrufen (Peters et al. 2003a). Die Art der Trafficking-Störungen bleibt jedoch größtenteils unbekannt. Weitere Untersuchungen müssen hier klären, ob ABCB auf molekularer Ebene mit einer oder mehreren dieser Trafficking-Defekte in Verbindung zu bringen ist. Es könnte durch ABCB eine Retention im Endoplasmatischen Retikulum initiiert werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer ABCB-vermittelten Interferenz des sekretorischen Weges im Golgi-Apparat. Kollokalisationsstudien könnten näheren Aufschluss geben, auf welcher Ebene das ROMK-Trafficking gestört wird.

Hier ist zu beachten, dass das ROMK-Protein in *Xenopus laevis* Oozyten normalerweise effizient an die Zelloberfläche transportiert wird, während seine Oberflächenexpression in kultivierten Säugerzellen aus bisher unbekanntem Gründen sehr gering ist. Dort akkumuliert es vorwiegend im ER und wird anschließend degradiert (Brejon et al. 1999; Yoo et al. 2005).

Dabei ist das Trafficking von ROMK zur Zellmembran temperaturabhängig. Brejon et al. zeigten in MDCK-Zellen (immortalisierte distal-tubuläre Hundepithelzellen), dass die Kanalproteine der ROMK-Variante Kir1.1a bei 37°C degradieren während sie bei 26°C stabil an der Oberfläche exprimiert werden. Sie wiesen darauf hin, dass eine akzessorische Untereinheit in vivo den Transport zur Membran unterstützen und zur Stabilität des Kanals beitragen könnte (Brejon et al. 1999). Für unsere Experimente inkubierten wir die Oozyten bei 16°C, die meisten Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es ist also durchaus denkbar, dass sich die Oberflächenexpression von ROMK bei Körpertemperatur in der menschlichen Niere vollkommen anders verhält, und sowohl ROMK als auch ABCB die Zelloberfläche ungestört erreichen. Schon geringe Unterschiede in der Umgebungstemperatur können sich möglicherweise auf die ROMK-Aktivität auswirken. So beobachteten wir eine leichte Zunahme der ROMK-generierten Ganzzellströme in den Oozyten, wenn die Messungen nicht direkt bei 16°C starteten, sondern sich die Temperatur des Mediums vor den Messungen an die Raumtemperatur angleichen konnte.

Gleichzeitig mit verschiedenen Temperaturbedingungen können auch weitere Proteine an der Modulation des ROMK-Traffickings beteiligt sein. Zum Beispiel interagiert ROMK mit den Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschfaktoren NHERF1 und 2 sowie CFTR über PDZ-Domänen. Dabei scheint NHERF in Anwesenheit von CFTR die Interaktion und damit Oberflächenexpression mit ROMK entscheidend zu beeinflussen. NHERF besitzt zwei PDZ-Bindedomänen, wobei wahrscheinlich jeweils eine mit ROMK und eine mit CFTR interagiert (Yoo et al. 2004).

Es ist bekannt, dass eine PKA-abhängige Phosphorylierung von ROMK zu einer erhöhten Anzahl von aktiven Kanälen in der Membran führt. Yoo et al. überprüften, ob eine Punktmutation an der Phosphorylierungsstelle S44 eine zusätzliche Hochregulierung von ROMK durch die Serum-Glukokortikoid-induzierte Kinase SGK1 beeinflusst. Sie fanden, dass die Mutation zu einer dramatischen Abschwächung der makroskopischen Ströme, sowie zu einer stark verminderten Oberflächenexpression des Kanalproteins führte (Yoo et al. 2003). Die aldosteronabhängige SGK1 kann damit als weiteres Protein mit Einfluss auf das ROMK-Trafficking angesehen werden. Es ist also wahrscheinlich, dass die ROMK Oberflächenexpression in vivo durch mehrere assoziierte Proteine beeinflusst wird und ABCB nur einen der Interaktionspartner darstellt.

Sollte es sich bewahrheiten, dass ABCB auch in vivo für eine Retention von ROMK in intrazellulären Kompartimenten verantwortlich ist, so stellt sich die Frage, ob durch medikamentöse Beeinflussung des ABC-Transporters eine gesteigerte ROMK-Funktion erreicht werden kann. Aufgrund der Vermittlung einer multiplen pharmakologischen Resistenz in Tumorzellen durch ABCB wurde schon intensiv nach Inhibitoren des Transporters gesucht. Unter anderem wird ABCB, wahrscheinlich in Analogie zum SUR in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle, durch Sulfonyl-Harnstoffe inhibiert, was aufgrund der engen Verwandtschaft der beiden ABC-Proteine nicht überrascht. Golstein et al. wiesen einen Effekt von Glibenclamid in verschiedenen Tumorzelllinien nach, die ABCB überexprimierten (Golstein et al. 1999). Außerdem wird eine Hemmung durch Verapamil beschrieben (Toffoli et al. 1995). Diese Beispiele sollen hier nur veranschaulichen, dass durchaus gängige Medikamente als ABCB-Inhibitoren in Betracht gezogen werden könnten.

#### **4.3.2 Schlussfolgerungen**

Auf welche Art und Weise der ROMK-Kaliumkanal und der ABCB-Transporter auf molekularer Ebene miteinander interagieren, darüber kann hier nur spekuliert werden. Die gezeigten Experimente sind Bestandteil von Grundlagenexperimenten. Die physiologische Verbindung zwischen ABCB und ROMK wird hier erstmalig gezeigt, so dass bisher keine vergleichbaren Daten zur Verfügung stehen. Dennoch gehen wir aufgrund unserer Ergebnisse davon aus, dass mit dem ABCB-Transporter ein neuer ROMK-Interaktionspartner gefunden wurde. Im *Xenopus*-Expressionssystem drückt sich die Interaktion in einer Trafficking-Modulation mit Minderung der Oberflächenexpression von ROMK aus. Dies ist insofern von besonderem Interesse, weil Mutationen im *KCNJ1*-Gen, die das ROMK-Trafficking betreffen, in der Pathogenese des antenatalen Bartter-Syndroms von entscheidender Bedeutung sind.

Ob ABCB eine  $\beta$ -Untereinheit des 70pS-Kanals in der TAL oder ein akzessorisches Molekül des 35pS-ROMK-Kanals darstellt, kann mit dieser Arbeit weder bestätigt noch verneint werden. In weiteren Untersuchungen z.B. zur Einzelkanalaktivität mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik könnten jedoch entscheidende Informationen über mögliche heteromultimere Kanäle aus ROMK und ABCB gewonnen werden.



#### 4.4 Ausblick

Das Outcome von Patienten, die unter hereditären Salzverlusttubulopathien mit sekundärer Hypokaliämie leiden, ist unter anderem von zwei wesentlichen Elementen abhängig. Zum einen ist eine frühzeitige Diagnosestellung von immenser Bedeutung für eine adäquate Behandlung, zum anderen bedarf es eines gezielten Einsatzes von Medikamenten zur Symptomminderung. Der Diagnosezeitpunkt kann durch ein rechtzeitiges evtl. pränatales genetisches Screening vorverlagert werden. Leider werden bisher nur ca. 60% der genetisch bedingten SLTs durch so ein Screening erfasst.

Sollte das ABCB-Protein in weiteren Untersuchungen als entscheidender Modulator (z.B. als  $\beta$ -Untereinheit) des ROMK-Kanals identifiziert werden, könnten Patientenkollektive auch auf ABCB-Mutationen getestet werden, wodurch die Sensitivität des bisher bestehenden Screenings ansteigen würde.

Im Weiteren ist zu beachten, dass bisher keine kausale Therapie der Bartter-ähnlichen Salzverlusttubulopathien zu Verfügung steht. Zur Zeit ist die einzige medikamentöse Therapieoption, neben dem Ausgleich von Wasser- und Elektrolytverlusten, die Behandlung mit COX-Inhibitoren wie Indomethacin, um den Effekten einer drastisch gesteigerten Prostaglandinsynthese entgegenzuwirken. Die dauerhafte Gabe von Medikamenten dieser Gruppe ist jedoch mit z.T. erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Mit der Identifizierung und funktionellen Charakterisierung von Proteinen, die im Prozess der tubulären Salzurückgewinnung beteiligt sind, werden Schritte unternommen, um mögliche neue Angriffspunkte für Medikamente zu eruieren. Die Entdeckung einer physiologischen Interaktion von ROMK mit ABCB ist hierfür ein erster Schritt und leistet gleichzeitig einen Beitrag zur Aufklärung der komplexen Pathomechanismen in der Entstehung hereditärer Salz-Verlust-Tubulopathien.

## 5 Zusammenfassung

In der Entstehung von hereditären Bartter-ähnlichen Salzverlusttubulopathien spielt der einwärtsgerichtete ROMK-Kalium-Kanal mit Sitz im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife eine entscheidende Rolle. Insbesondere die enge funktionale Kopplung der verschiedenen Transporter in den Tubulusepithelzellen führt in diesem Nephronabschnitt bei Ausfall eines Elements zum Zusammenbruch des gesamten Resorptionsmechanismus.

In der vorliegenden Arbeit wurde das ABCB-Protein als ein möglicher neuer Interaktionspartner des ROMK-Kanals identifiziert und die Interaktion der beiden Proteine funktionell in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht.

Bei elektrophysiologischen Experimenten mit Hilfe der Two-Electrode-Voltage-Clamp (TEVC) konnte hier erstmals eine funktionelle Interaktion von ROMK und ABCB beobachtet werden. In Anwesenheit des ABC-Transporters verringerten sich die ROMK-generierten Ganzzellströme in Abhängigkeit von der injizierten ABCB-mRNA-Menge bis zu 100%.

Zur Spezifizierung des gezeigten Effektes führten wir in einem zweiten Schritt eine Oberflächenquantifizierung von Hämagglutinin markiertem ROMK-Kanalprotein per Antikörperdetektion durch. Es zeigte sich, dass die Oberflächenexpression von ROMK-HA in den Oozyten bei Koexpression mit ABCB um ca. 60% vermindert ist. Daraus lässt sich schließen, dass ABCB im heterologen Expressionssystem das Trafficking des ROMK-Kanals zur Zelloberfläche behindert.

Ob dies auch in vivo der Fall ist, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Ebenso bleibt die Frage offen, ob ABCB als  $\beta$ -Untereinheit von ROMK fungiert und evtl. Teil des 70pS Kanals in der TAL ist. Es wäre durchaus denkbar, dass die beiden Proteine Kanalheteromultimere bilden und diese aus bisher unbekanntem Gründen in den Oozyten nur sehr begrenzt die Zelloberfläche erreichen. Patch-Clamp-Untersuchungen zur Einzelkanalaktivität können hier näheren Aufschluss geben.

Eine Interaktion in Form einer Heteromultimerisierung von Kir-Kanälen und ABC-Transportern wie z.B. in der pankreatischen  $\beta$ -Zelle zwischen Kir6.2 und dem Sulfonyl-Harnstoff-Rezeptor ist durchaus nicht ungewöhnlich. Des Weiteren zeigen Daten aus verschiedenen Studien mit Knockout-Mäusen starke Homologien hinsichtlich des renalen Phänotyps zwischen ABCB-defizienten Mäusen und ROMK-defizienten Mäusen.

Vor diesem Hintergrund liefert die vorliegende Arbeit weitere Indizien dafür, dass zwischen ROMK und ABCB auch in vivo eine enge biophysikalische Verknüpfung mit physiologischer Relevanz besteht.

## 6 Verwendete Abkürzungen

[K <sup>+</sup> ]	Kaliumionenkonzentration
°C	Grad Celsius
μA	Mikroampere
μl	Mikroliter
5'UTR/3'UTR	5'/3'-untranslatierte Region
A	Ampere
ABCB	ATP-Cassete-Binding-Transporter TypB
aBS/HPS	antenatales Bartter-Syndrom bzw. Hyperprostaglandin-E-Syndrom
aBS/HPS + SND	antenatales Bartter-Syndrom mit Innenohr- Taubheit
ADH	antidiuretisches Hormon
AgCl	Silberchlorid
Amp.	Ampicillin
Anti-rat-POD IgG-Antikörper	peroxidase conjugated Affini Pure F(ab') <sub>2</sub> Fragment goat anti-rat IgG-Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare (base pairs)
BS	klassisches Bartter-Syndrom
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
CCD	“Cortical Collecting Duct”: Kortikales Sammelrohr
CCT	„Cortical Connecting Tubule“: kortikaler Verbindungstubulus
c-DNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
Cl <sup>-</sup>	Chloridionen
CIC-Ka/CIC-Kb	Basale Chloridkanäle im distalen Nephron

---

cm	Zentimeter
COX-2	Cyclooxygenase Typ 2
C-Terminus.	Carboxy-Terminus eines Proteins
DCT	„Distal Convolutet Tubule“: distales Konvolut des Nephrons
ENaC	Aldosteron- und ADH- aktivierbarer Natrium Kanal des Verbindungstubulus und Sammelrohrs
GS	Gitelman-Syndrom
h	Stunde(n)
HA-	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyl)piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure), dient als Puffer
I	Stromstärke
Ig	Immunglobulin
K <sup>+</sup>	Kaliumionen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kir2.1	Einwärts gleichrichtender Kaliumkanal 2.1
Kir-Kanäle	Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle („inward-rectifier“)
LB-Nähr-Medium	Luria-Bertani-Nähr-Medium
M	Mittelwert
MCD	„Medullary Collecting Duct“: medulläres Sammelrohr
MD	Macula Densa
MDCK-Zellen	immortalisierte distal-tubuläre Hundepithelzellen
MDR	Multi-Drug-Resistance
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	Millimol
mMmM-Kit	mMessage mMachine High Yield Capped RNA Transcription Kit
MQ-H <sub>2</sub> O	Entionisiertes "Milli-Q" Wasser
m-RNA	Messenger-Ribonucleinsäure
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
n	Anzahl (Oozyten-Messungen)
Na <sup>+</sup>	Natriumionen
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBD	Nukleotid-Bindungs-Domäne
NCCT	Thiazid-sensitiver Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> -Symportcarrier
ng	Nanogramm
NHERF	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauschfaktoren
NKCC2	Na <sup>+</sup> - 2Cl <sup>-</sup> - K <sup>+</sup> Cotransporter Typ 2
NS	„nicht signifikant“, p-Wert ≥ 0,05
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
NTP	Nucleotid Triphosphat
PGE2	Prostaglandin E2
pH-Wert	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen Konzentration
PIP2	Phosphoinositolphosphatase
PKA/PKC	Proteinkinase Typ A/ TypC
pS	Pikosiemens
p-Wert	Wert für Signifikanzlevel
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium Channel
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RUL/s	relative Lichteinheiten pro Sekunde (relative light units per second)
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat

---

SGK	Serum- und Glucocorticoid-regulierte Kinase
SUR	Sulfonyl-Harnstoff-Rezeptor
TAE	Tris-Acatat-Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
tAL	„Thin Ascending Limb“ dünner aufsteigender Teil der Henle-Schleife
TAL	„Thick Ascending Limb“: dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife
TEMED	Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin
TEVC	Two-Electrode-Voltage-Clamp
TGF	tubulo-glomeruläres Feedback
TK	Tyrosin Kinase
TM/TMD	Transmembrandomäne
Tris-	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TTBS	Tween 20 + Tris-Buffered-Saline
V	Spannung (Voltage)
Y2H	Yeast-Two-Hybrid
α-	Alpha-
β-	Beta-

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbott A (2002) The society of proteins. *Nature* 417:894-896
- Aguilar-Bryan L, Clement JP, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J (1998) Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. *Physiol Rev.* 78:227-245
- Amirlak I, Dawson KP (2000) Bartter syndrome: an overview. *QJM.* 93:207-215
- Birkenhager R, Otto E, Schurmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Maier-Lutz I, Beekmann F, Fekete A, Omran H, Feldmann D, Milford DV, Jeck N, Konrad M, Landau D, Knoers NV, Antignac C, Sudbrak R, Kispert A, Hildebrandt F (2001) Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat. Genet.* 29:310-314
- Bleich M, Schlatter E, Greger R (1990) The luminal K<sup>+</sup> channel of the thick ascending limb of Henle's loop. *Pflugers Arch.* 415:449-460
- Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, Yang Y, Brenner BM, Hebert SC (1995) ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am. J. Physiol* 268:F1132-F1140
- Brejon M, Le Maout S, Welling PA, Merot J (1999) Processing and transport of ROMK1 channel is temperature-sensitive. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261:364-371
- Castillo G, Vera JC, Yang CP, Horwitz SB, Rosen OM (1990) Functional expression of murine multidrug resistance in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:4737-4741
- Dong K, Xu J, Vanoye CG, Welch R, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC (2001) An amino acid triplet in the NH<sub>2</sub> terminus of rat ROMK1 determines interaction with SUR2B. *J. Biol. Chem.* 276:44347-44353
- Dumont J (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin) I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals . *J Morph* 136:153-180
- Ernest S, Bello-Reuss E (1999) Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10:2306-2313
- Estevez R, Boettger T, Stein V, Birkenhager R, Otto E, Hildebrandt F, Jentsch TJ (2001) Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature* 414:558-561
- Giebisch G (1998) Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am. J. Physiol* 274:F817-F833



- Golstein PE, Boom A, van Geffel J, Jacobs P, Masereel B, Beauwens R (1999) P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Pflugers Arch.* 437:652-660
- Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233:177-182
- Hausdorff SF, Goldstein SA, Rushin EE, Miller C (1991) Functional characterization of a minimal K<sup>+</sup> channel expressed from a synthetic gene. *Biochemistry* 30:3341-3346
- Hebert SC (2003) Bartter syndrome. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 12:527-532
- Hebert SC, Desir G, Giebisch G, Wang W (2005) Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiol Rev.* 85:319-371
- Hebert SC, Wang WH (1997) Structure and function of the low conductance KATP channel, ROMK. *Wien. Klin. Wochenschr.* 109:471-476
- Hilken G, Iglauer F., Richter H.-P. (1997) Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Labortier: Biologie, Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC (1993) Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362:31-38
- Huls M, Kramers C, Levchenko EN, Wilmer MJ, Dijkman HB, Kluijtmans LA, van der Hoorn JW, Russel FG, Masereeuw R (2007) P-glycoprotein-deficient mice have proximal tubule dysfunction but are protected against ischemic renal injury. *Kidney Int.* 72:1233-1241
- Jan LY, Jan YN (1994) Potassium channels and their evolving gates. *Nature* 371:119-122
- Jeck N, Reinalter SC, Henne T, Marg W, Mallmann R, Pasel K, Vollmer M, Klaus G, Leonhardt A, Seyberth HW, Konrad M (2001) Hypokalemic salt-losing tubulopathy with chronic renal failure and sensorineural deafness. *Pediatrics* 108:E5
- Jeck N, Schlingmann KP, Reinalter SC, Komhoff M, Peters M, Waldegger S, Seyberth HW (2005) Salt handling in the distal nephron: lessons learned from inherited human disorders. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 288:R782-R795
- Jones PM, George AM (2004) The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol. Life Sci.* 61:682-699
- Kast C, Canfield V, Levenson R, Gros P (1996) Transmembrane organization of mouse P-glycoprotein determined by epitope insertion and immunofluorescence. *J. Biol. Chem.* 271:9240-9248

- Keller K, Olsowski A (1999) Probing the local secondary structure and structure-function relationship of the glucosetransporter GLUT1 by cysteine mutation and cysteine-scanning mutagenesis. *Recent Res Devel Biochem* 1:29-44
- Klein I, Sarkadi B, Varadi A (1999) An inventory of the human ABC proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1461:237-262
- Konstas AA, Dabrowski M, Korbmacher C, Tucker SJ (2002a) Intrinsic sensitivity of Kir1.1 (ROMK) to glibenclamide in the absence of SUR2B. Implications for the identity of the renal ATP-regulated secretory K<sup>+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 277:21346-21351
- Konstas AA, Koch JP, Tucker SJ, Korbmacher C (2002b) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent up-regulation of Kir1.1 (ROMK) renal K<sup>+</sup> channels by the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 277:25377-25384
- Krishnan SN, Desai T, Ward DC, Haddad GG (1995) Isolation and chromosomal localization of a human ATP-regulated potassium channel. *Hum. Genet.* 96:155-160
- Kuruma A, Hartzell HC (1999) Dynamics of calcium regulation of chloride currents in *Xenopus* oocytes. *Am. J Physiol* 276:C161-C175
- Kwei GY, Alvaro RF, Chen Q, Jenkins HJ, Hop CE, Keohane CA, Ly VT, Strauss JR, Wang RW, Wang Z, Pippert TR, Umbenhauer DR (1999) Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in *mdr1a* P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos.* 27:581-587
- Landau D (2004) Potassium handling in health and disease: lessons from inherited tubulopathies. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 2:203-208
- Lee WS, Hebert SC (1995) ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. I. Expression in rat distal nephron segments. *Am. J. Physiol* 268:F1124-F1131
- Lin D, Sterling H, Lerea KM, Giebisch G, Wang WH (2002) Protein kinase C (PKC)-induced phosphorylation of ROMK1 is essential for the surface expression of ROMK1 channels. *J. Biol. Chem.* 277:44278-44284
- Lorenz JN, Baird NR, Judd LM, Noonan WT, Andringa A, Doetschman T, Manning PA, Liu LH, Miller ML, Shull GE (2002) Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome. *J. Biol. Chem.* 277:37871-37880
- Lu M, Leng Q, Egan ME, Caplan MJ, Boulpaep EL, Giebisch GH, Hebert SC (2006) CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. *J. Clin. Invest* 116:797-807
- Lu M, Wang T, Yan Q, Wang W, Giebisch G, Hebert SC (2004) ROMK is required for expression of the 70-pS K channel in the thick ascending limb. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 286:F490-F495

- MacGregor GG, Xu JZ, McNicholas CM, Giebisch G, Hebert SC (1998) Partially active channels produced by PKA site mutation of the cloned renal K<sup>+</sup> channel, ROMK2 (kir1.2). *Am. J. Physiol* 275:F415-F422
- Mastroianni N, De Fusco M, Zollo M, Arrigo G, Zuffardi O, Bettinelli A, Ballabio A, Casari G (1996) Molecular cloning, expression pattern, and chromosomal localization of the human Na-Cl thiazide-sensitive cotransporter (SLC12A3). *Genomics* 35:486-493
- McNicholas CM, Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G, Egan ME (1996a) Sensitivity of a renal K<sup>+</sup> channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:8083-8088
- McNicholas CM, MacGregor GG, Islas LD, Yang Y, Hebert SC, Giebisch G (1998) pH-dependent modulation of the cloned renal K<sup>+</sup> channel, ROMK. *Am. J. Physiol* 275:F972-F981
- McNicholas CM, Yang Y, Giebisch G, Hebert SC (1996b) Molecular site for nucleotide binding on an ATP-sensitive renal K<sup>+</sup> channel (ROMK2). *Am. J. Physiol* 271:F275-F285
- Mellman I (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:575-625
- Peters M, Ermert S, Jeck N, Derst C, Pechmann U, Weber S, Schlingmann KP, Seyberth HW, Waldegger S, Konrad M (2003a) Classification and rescue of ROMK mutations underlying hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome. *Kidney Int.* 64:923-932
- Peters M, Konrad M, Seyberth HW (2003b) Hereditary Hypokalemic Salt-losing Tubular Disorders. *Saudi. J. Kidney Dis. Transpl.* 14:386-397
- Reinalter S, Devlieger H, Proesmans W (1998) Neonatal Bartter syndrome: spontaneous resolution of all signs and symptoms. *Pediatr. Nephrol.* 12:186-188
- Reinalter SC, Jeck N, Brochhausen C, Watzer B, Nusing RM, Seyberth HW, Komhoff M (2002) Role of cyclooxygenase-2 in hyperprostaglandin E syndrome/antenatal Bartter syndrome. *Kidney Int.* 62:253-260
- Rodriguez-Soriano J (1998) Bartter and related syndromes: the puzzle is almost solved. *Pediatr. Nephrol.* 12:315-327
- Rosenberg MF, Callaghan R, Modok S, Higgins CF, Ford RC (2005) Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J. Biol. Chem.* 280:2857-2862
- Rubenstein RC, Egan ME, Zeitlin PL (1997) In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin. Invest* 100:2457-2465

- Ruknudin A, Schulze DH, Sullivan SK, Lederer WJ, Welling PA (1998) Novel subunit composition of a renal epithelial KATP channel. *J. Biol. Chem.* 273:14165-14171
- Sackin H, Palmer LG, Krambis M (2004) Potassium-dependent slow inactivation of Kir1.1 (ROMK) channels. *Biophys. J.* 86:2145-2155
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384:80-83
- Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev.* 86:1179-1236
- Schlingmann KP, Konrad M, Jeck N, Waldegger P, Reinalter SC, Holder M, Seyberth HW, Waldegger S (2004) Salt wasting and deafness resulting from mutations in two chloride channels. *N. Engl. J. Med.* 350:1314-1319
- Schulte U, Hahn H, Konrad M, Jeck N, Derst C, Wild K, Weidemann S, Ruppertsberg JP, Fakler B, Ludwig J (1999) pH gating of ROMK (K(ir)1.1) channels: control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:15298-15303
- Seyberth HW (1994) Das Hyperprostaglandin-E2-Syndrom. *Monatsschr Kinderheilkd* 142:392-395
- Seyberth HW, Koniger SJ, Rascher W, Kuhl PG, Schweer H (1987) Role of prostaglandins in hyperprostaglandin E syndrome and in selected renal tubular disorders. *Pediatr. Nephrol.* 1:491-497
- Silbernagl S DA (2003) Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme Verlag, Rüdigerstraße 14, Stuttgart
- Stühmer W (1992) Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol* 207:319-339
- Tanemoto M, Vanoye CG, Dong K, Welch R, Abe T, Hebert SC, Xu JZ (2000) Rat homolog of sulfonyleurea receptor 2B determines glibenclamide sensitivity of ROMK2 in *Xenopus laevis* oocyte. *Am. J Physiol Renal Physiol* 278:F659-F666
- Toffoli G, Simone F, Corona G, Raschack M, Cappelletto B, Gigante M, Boiocchi M (1995) Structure-activity relationship of verapamil analogs and reversal of multidrug resistance. *Biochem Pharmacol.* 50:1245-1255
- Tucker SJ, Ashcroft FM (1998) A touching case of channel regulation: the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8:316-320
- Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S (2000) The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* 10:1-12
- Wang WH, Lin DH, Sterling H (2002) Regulation of ROMK channels by protein tyrosine kinase and tyrosine phosphatase. *Trends Cardiovasc. Med.* 12:138-142

- Xu JZ, Hall AE, Peterson LN, Bienkowski MJ, Eessalu TE, Hebert SC (1997) Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *Am. J Physiol* 273:F739-F748
- Yague E, Armesilla AL, Harrison G, Elliott J, Sardini A, Higgins CF, Raguz S (2003) P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation. *J Biol. Chem.* 278:10344-10352
- Yoo D, Fang L, Mason A, Kim BY, Welling PA (2005) A phosphorylation-dependent export structure in ROMK (Kir 1.1) channel overrides an endoplasmic reticulum localization signal. *J. Biol. Chem.* 280:35281-35289
- Yoo D, Flagg TP, Olsen O, Raghuram V, Foskett JK, Welling PA (2004) Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J. Biol. Chem.* 279:6863-6873
- Yoo D, Kim BY, Campo C, Nance L, King A, Maouyo D, Welling PA (2003) Cell surface expression of the ROMK (Kir 1.1) channel is regulated by the aldosterone-induced kinase, SGK-1, and protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 278:23066-23075
- Zhou H, Tate SS, Palmer LG (1994) Primary structure and functional properties of an epithelial K channel. *Am. J Physiol* 266:C809-C824

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ionenkanäle und Transporter in verschiedenen Nephronabschnitten .....	3
Abbildung 2: Topologie und funktionelle Domänen von ROMK (1-3).....	9
Abbildung 3: ROMK beeinflussende Regulationsfaktoren (Giebisch 1998) .....	12
Abbildung 4: Der ATP-Cassette-Binding-Transporter Typ B .....	14
Abbildung 5: Kandidatengene angeborener Salzverlustkrankungen .....	16
Abbildung 6: pSGEM Vektormap .....	29
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (nach v. Rosenberg Lipinsky) .....	33
Abbildung 8: Linearisierte DNA-Fragmente sowie m-RNA in der Gelelektrophorese.....	40
Abbildung 9: Inhibition der ROMK-Kanäle durch ABCB .....	41
Abbildung 10: Effekt von Barttin auf ROMK .....	42
Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Inhibition der ROMK-Kanäle durch ABCB.....	43
Abbildung 12: ROMK-spezifischer Effekt des ABCB-Proteins im Vergleich mit dem Kir2.1-Kanal .....	44
Abbildung 13: Effekt des ABCB-Proteins auf ROMK-HA .....	46
Abbildung 14: Effekt von ABCB auf die ROMK-Oberflächenexpression .....	47
Abbildung 15: Schema der Strom-Spannungs-Beziehung eines $K^+$ -Einwärtsgleichrichters (z.B. ROMK) .....	54

### 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gene und Genprodukte, die an der Entstehung von Salzverlust-Tubulopathien beteiligt sind und ihre Lokalisation entlang des Nephrons .....	4
Tabelle 2: Instrumente und Hilfsmittel .....	21
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen .....	22
Tabelle 4: Verdünnung der Antikörper .....	24
Tabelle 5: Verwendete Inserts, Vektoren und entsprechende Restriktionsenzyme.....	30
Tabelle 6: Inserts, Promotoren und Restriktionsenzyme für die Linearisierung .....	30
Tabelle 7: Injizierte m-RNA-Mengen .....	39

## **9 Anhang**

### **9.1 Verzeichnis akademischer Lehrer**

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren folgende Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Bertalanffy, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Geus, Christiansen, Gerdes, Gress, Gudermann, Hamer, Happle, Hertl, Hoffmann, Hörle, Jungclas, Kann, Klenk, Klose, König, Koolman, Krieg, Kroll, Köhler, Lang, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Oertel, Printz, Remschmidt, Renz, Röhm, Röper, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Schrader, Seitz, Studer, Vogelmeier, Waldegger, Weihe, Westermann, Werner, Wulf.

## 9.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen denjenigen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. med. R. Maier danke ich für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit am Medizinischen Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin in Marburg anfertigen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Siegfried Waldegger für seine stets zielführende Beratung hinsichtlich der Konzeption und Durchführung der Arbeit sowie der Erstellung der Dissertationsschrift und für seine ermutigenden Worte in dieser Sache.

Frau Dr. Aparna Renigunta danke ich sehr, da sie mich insbesondere während meiner Arbeit im Labor kompetent und geduldig mit den Methoden vertraut machte und mir stets beratend bei der Durchführung der Experimente zur Seite stand.

Ich danke meiner Familie für ihren Halt und ihre Unterstützung auch in schwierigen Zeiten.

Besonders danken möchte ich auch meiner Tante Lena, Urs Reif, meiner Wohngemeinschaft und meinen Freunden, die alle auf ihre eigene Art und Weise zur Vollendung dieses Projekts beigetragen haben.



