



















# Zusammenfassung

Die Ionenkanäle des renalen Tubulus- und Sammelrohrsystems bestimmen die Funktion der adulten Säugetiere. Sie müssen mit der Entwicklung der permanenten Niere (Metanephrogenese) erworben werden und können auch entwicklungspezifische Aufgaben haben. **Ziel dieser Arbeit ist die erstmalige systematische Beschreibung der Expression und entwicklungspezifischen Rolle von Ionenkanälen während der Metanephrogenese.**

## Methoden

Die ontogenetische mRNA-Expression der Kir  $K^+$ -Kanal-Untereinheiten Kir6.1, SUR2 und ROMK1-3 (Kir1.1a-c) wurde mittels RT-PCR von Primärkulturen im Sammelrohrepithel quantifiziert, die ontogenetische Kir6.1- und ROMK-Protein-Expression mittels Immunhistochemie in Sammelrohr- und Nephron-Epithelien untersucht. Der Effekt von cAMP auf die ROMK-mRNA-Expression wurde gemessen und der Einfluss von  $K^+$ -Kanalmodulatoren auf das Wachstum von Nephron-Kulturen *in vitro* und von HEK293 Nierenepithel-Zellen bestimmt. Ferner wurde die ontogenetische mRNA-Expression des ENaC- $Na^+$ -Kanals und der Cl-Kanäle CFTR, CLC-2 und ICLn mittels RT-PCR im Sammelrohrepithel quantifiziert. Alle Experimente wurden an Ratten oder Mäusen durchgeführt.

## Ergebnisse

(i) Die mRNA der  $K_{NDP}$ -( $K_{ATP}$ )-Kanaluntereinheiten Kir6.1/SUR2 war in frühen Ureterknospen-Generationen (embryonaler Tag E14) hoch exprimiert und nach der Geburt herunterreguliert. In gleicher Weise war Kir6.1-Protein im embryonalen Sammelrohrepithel und Nephron ubiquitär apolar exprimiert. Im Gegensatz hierzu war Kir6.1 im adulten Nephron ausschließlich im Proximalen Tubulus nachweisbar (apikal > basolateral). Die spezifische Aktivierung von  $K_{NDP}$ -( $K_{ATP}$ )-Kir6.1/SUR2-Kanälen in Nephronkulturen und HEK293-Zellen steigerte die Zellproliferation, was auf eine wachstumsregulierende Rolle der frühen Kir6.1/SUR2-Expression hinweist.

Somit könnten zelluläre Entwicklungsprogramme der Niere die Wachstumsrate über die Expression von  $K^+$ -Kanälen regulieren.

(ii) Die mRNA des apikalen sekretorischen Sammelrohr- $K^+$ -Kanals ROMK2 (Kir1.1b) war von Beginn der Entwicklung an in Ureterknospen/Sammelrohrethelien exprimiert und stieg während der Reifung des Kortikalen Sammelrohrs um den Faktor 4 an (postnatale Tage P7-28). Diese Zunahme spiegelt den Erwerb der adulten  $Na^+$ -retinierenden Funktion des Sammelrohrethels wider. Die Protein-Expression von ROMK war in embryonalen Nierenepithelien ubiquitär und apolar nachweisbar, jedoch postnatal auf die apikale Plasmamembran des aufsteigenden Teils der Henle'schen Schleife und des Sammelrohrs beschränkt. Die ROMK-mRNA-Expression in embryonalen Sammelrohrethelien war durch cAMP stimulierbar.

(iii) Während der frühen Genese des Sammelrohrsystems wurden die mRNAs der  $Cl^-$ -Kanäle CFTR, CLC-2 und ICLn exprimiert, die sehr wahrscheinlich an der aus Ureterknospen bekannten hohen fraktionellen  $Cl^-$ -Leitfähigkeit beteiligt sind. Während der postnatalen Sammelrohrethel-Reifung wurde die mRNA des apikalen  $Na^+$ -Kanals ENaC transkriptionell hochreguliert. So kann rechtzeitig die  $NaCl$ -resorbierende Funktion der Niere des Neugeborenen sicher gestellt werden (zusammen mit der Heraufregulation von ROMK).

# Kapitel 1

## Einleitung

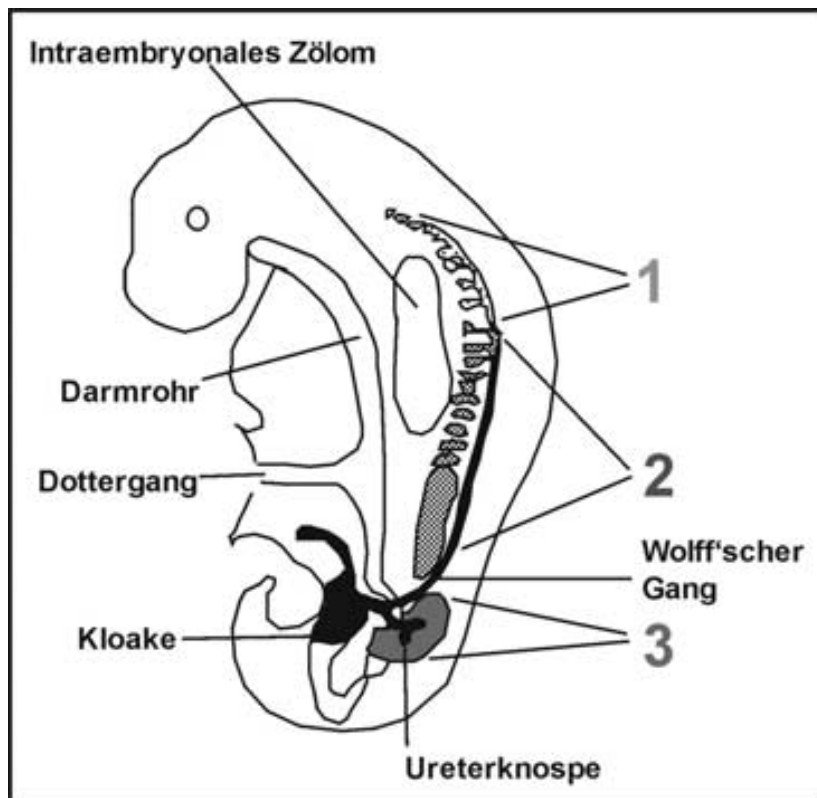
### 1.1 Pro- und Mesonephrogenese

Reptilien, Vögel und Säuger bilden während der Ontogenese drei Nierentypen: (i) die Vorniere (Pronephros), (ii) die Urniere (Mesonephros) und (iii) die Nachniere (Metanephros) (Langman 1985). Während sich Vor- und Urniere im Laufe der Embryonalentwicklung wieder zurückbilden, persistiert das Metanephros als endgültige Niere des adulten Organismus. Die Analyse der Ionenkanal-Expression und -Funktion während der Entwicklung des Metanephros (Metanephrogenese) ist Gegenstand der hier vorgelegten Arbeit.

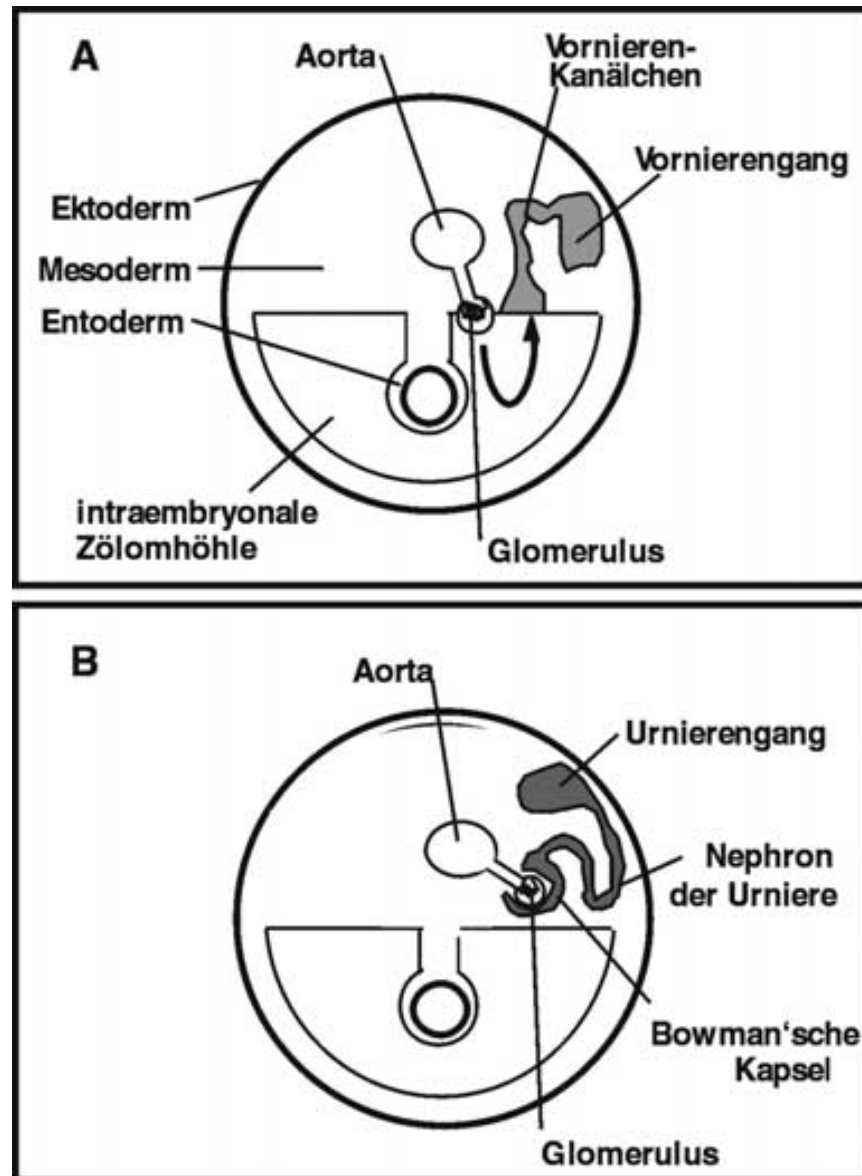
Fünf Wochen nach der Gestation sind im humanen Embryo alle drei Nierentypen gleichzeitig anzutreffen (**Abb. 1.1**). Jeder Typus setzt sich aus der funktionellen Grundeinheit des Nephrons zusammen. Nephrone sind epitheliale Tubuli, die proximal ein kapillär abgepresstes Ultrafiltrat aufnehmen und dieses nach distal in einen Ausführungsgang weiterleiten. Je nach Entwicklungsgrad der Epithelien kann die intratubuläre Flüssigkeit durch Reabsorption und Sekretion in ihrer Zusammensetzung modifiziert werden.

(i) Das rudimentäre Pronephros entsteht beim Menschen am 22. Tag beidseitig auf mehreren Segmenten des zervikalen Mesoderms (Stuart und Nigam 2000) (**Abb. 1.1**). Hier leitet je ein Vornierenkanälchen über einen Fimbrientrichter Flüssigkeit aus der intraembryonalen Zölmhöhle in einen gemeinsamen Ausführungsgang (Vornierengang) (**Abb. 1.2 A**). In direkter Nachbarschaft des Fimbrientrichters wird durch einen aus der Aorta gespeisten Glomerulus Ultrafiltrat in die intraembryonale Zölmhöhle sezerniert und über den Fimbrientrichter dem Nephron zugeleitet. Im Menschen ist dieses System rudimentär angelegt und nicht funktionsfähig. In Amphibienlarven und archaischen Fischen stellt es die endgültige Nierenform dar.

(ii) Während das Pronephros bereits wieder degeneriert, bildet sich ab dem 24. Tag aus dem thorakalen Mesoderm das Mesonephros (Stuart und Nigam 2000). Pro Segment entstehen mehrere Nephrone (**Abb. 1.1**), die nicht mehr über die intraembryonale Zölmhöhle, sondern direkt durch die Glomeruli, als spezialisiertes Nephrozoel, gespeist werden (**Abb. 1.2 B**), und distal in den Urnierengang (Wolff'scher Gang) konfluieren, der aus der Kloake hervorgeht (**Abb. 1.1**). Im Verlauf degeneriert die Anlage des Mesonephros wieder, wobei beim Mann einige Nierenkanäle und Teile des Wolff'schen Ganges als Nebennieren und Duktus Deferens (Samenleiter) bestehen bleiben. In Knochenfischen ist das Mesonephros als endgültige Niere realisiert.



**Abb. 1.1 – Die drei Nierenanlagen im Überblick.** Skizze eines humanen Embryos in der 5. Woche. Gezeigt sind von kranial nach kaudal die Anlagen des (1) Pronephros (zu diesem Zeitpunkt schon in Rückbildung), des (2) Mesonephros und des (3) Metanephros. Das organbildende intermediäre Mesoderm, bzw. die daraus hervorgegangenen Epithelien sind grau gerastert dargestellt. Der Wolff'sche Gang (schwarz dargestellt) bildet sich thorakal aus dem Urnierengang und ist mit der Kloake verbunden. Bei der Bildung des Metanephros sprießt aus dem Wolff'schen Gang die Ureterknospe in das metanephrische Mesenchym ein (3). Abbildung nach Langman (1997).

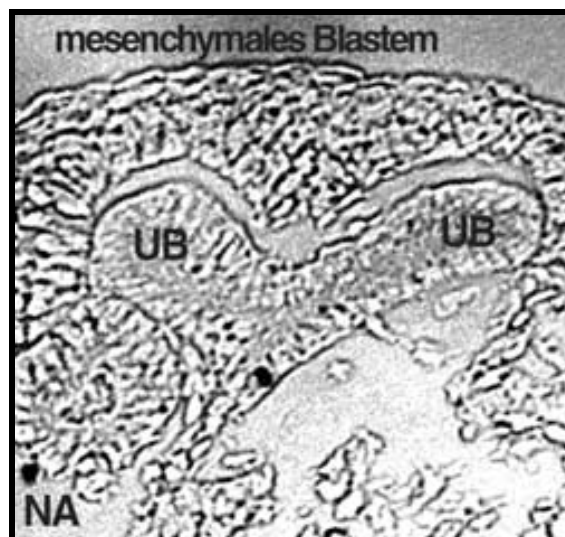


**Abb. 1.2 – Filtrationsapparat und Nephron von Pro- und Mesonephros.** **A:** Skizze eines humanen Embryos am 22. Tag (Querschnitt; zervikales Segment). Aus der paarig angeordneten Aorta (hier einseitig dargestellt) wird über einen Glomerulus ein Ultrafiltrat in die intraembryonale Zölonhöhle abgegeben, das über einen Sog in den Fimbrientrichter des Vorrierenkanälchens (grau dargestellt) eingesaugt und in den Vorrierengang geleitet wird. **B:** Skizze eines humanen Embryos am 28. Tag (Querschnitt; zervikales Segment). Aus der paarig angeordneten Aorta (hier einseitig dargestellt) wird über ein spezialisiertes Nephrozoel, den Glomerulus, ein Ultrafiltrat direkt in das Nephron der Urniere (grau dargestellt) abgegeben und über den Urnierengang in die Kloake drainiert. Die Bowman'sche Kapsel des proximalen Nephrons begrenzt das Nephrozoel. Abbildung nach Langman (1997).

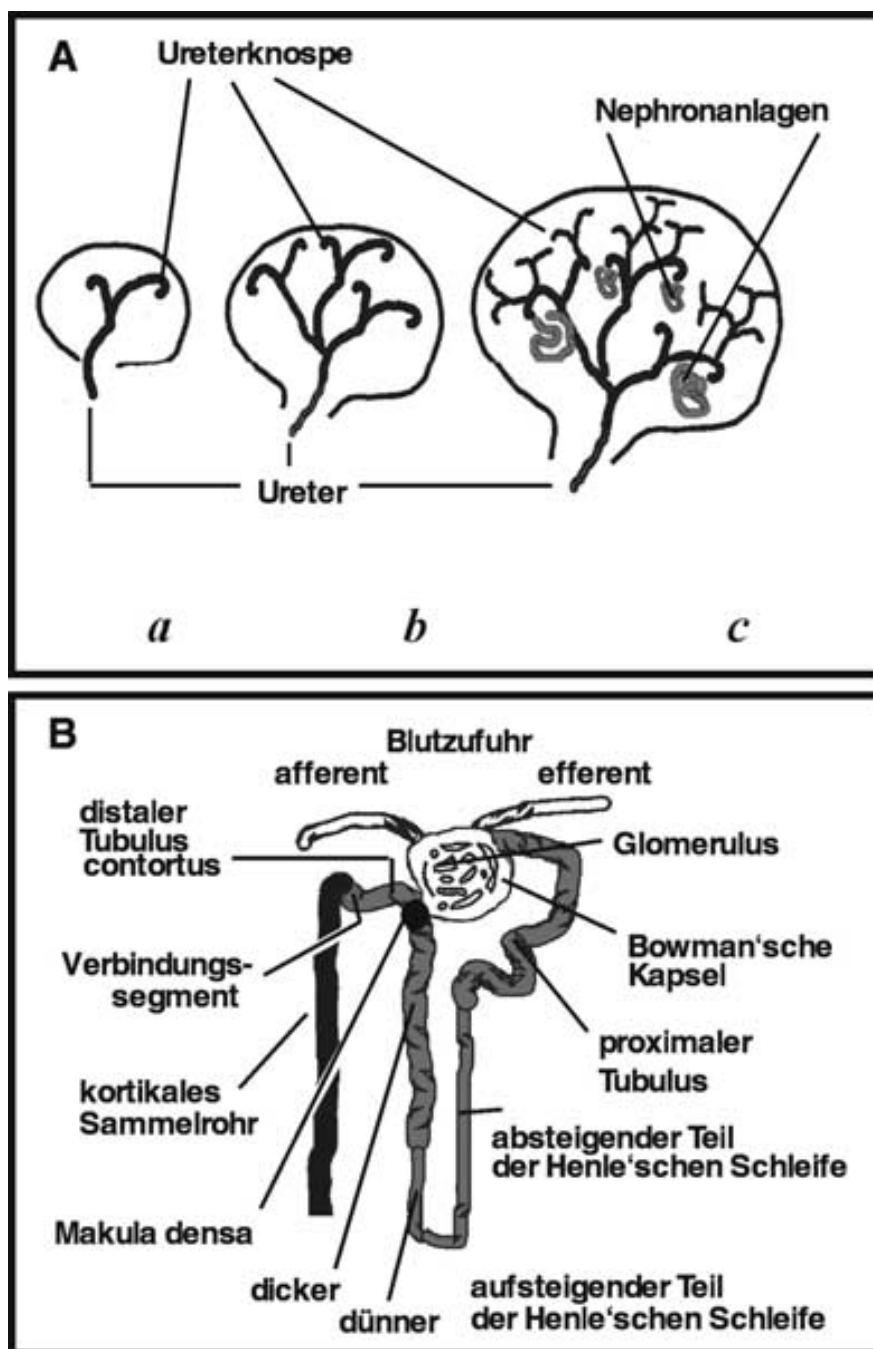
## 1.2 Metanephrogenese

Reptilien, Vögeln und Säugern ist als permanente Niere das *Metanephros* gemein. Es entsteht beim Menschen am Ende der 4. Woche (Ratte embryonaler (E) Tag 12) durch Aussprossung der Ureterknospe (UB) aus dem Wolff'schen Gang in das kaudal der Urniere gelegene metanephrogene Mesenchym (**Abb. 1.1**). In der Folge bildet sich durch Wachstum und dichotome Verzweigungsmorphogenese der Ureterknospe das Sammelrohrsystem der Niere (Saxén 1987). **Abb. 1.3** zeigt eine native Ureterknospe der Ratte am Tag E16.

Wie in **Abb. 1.4 A** skizziert, entwickeln sich parallel zum Sammelrohrsystem aus dem metanephrogenen Mesenchym die Nephrone. Diese bilden proximal einen Glomerulus mit Anschluss an die vaskuläre Versorgung. Sie fusionieren distal mit dem Sammelrohrsystem. **Abb. 1.4 B** zeigt schematisch ein adultes Nephron mit den einzelnen Segmenten und dem abführenden Sammelrohr. Die internationale Nomenklatur ist angegeben. Zusätzlich besteht eine vaskuläre Versorgung mit arteriellem Zu- und venösem Abfluss entlang des Tubulussystems (nicht gezeigt).



**Abb. 1.3** – Subkapsuläre Zone einer Rattenniere (E16) in der Lichtmikroskopie. Gezeigt sind zwei aus einer dichotomen Sammelrohr-Teilung hervorgegangene Ureterknospen (UB). Diesen liegt kranzförmig das mesenchymale Blastem an, aus dem sich durch mesenchymal-epitheliale Transformation das Nephronepithel bildet. Links ist eine so entstandene Nephron-Anlage (NA) im *Vesikel*-Stadium erkennbar.



**Abb. 1.4 – Skizze der Metanephrogenese und Anatomie des adulten Nephrons mit Sammelrohr.** Schwarz: Ureterknospen (UB) und Sammelrohre. Grau: Nephronanlagen und adultes Nephronepithel. **A:** Schematische Zusammenfassung der dichotomen Verzweigungsmorphogenese des Sammelrohrepithels nach Einwanderung der Ureterknospe in das metanephrogene Mesenchym. Gezeigt sind: *(a)* Mensch Tag 28/ Ratte Tag 12.5; *(b)* Ratte Tag 15; *(c)* Ratte Tag 18. **B:** Anatomie des adulten Nephrons (nach Kriz und Bankir 1988). Das Verbindungs-Segment (engl. connecting tubule/CNT) weist Zelltypen des distalen Tubulus contortus (DCT) und des Kortalen Sammelrohrs (CCD) auf. Im Kortalen Sammelrohr liegen neben dem Hauptzelltyp auch 30% Schaltzellen (engl. intercalated cells) vor. Funktionen der einzelnen Tubulus- und Sammelrohrsegmente siehe Kapitel 1.4.

Beim Menschen bilden sich ca. 1 Million Nephrone pro Niere. Diese sind ab dem 5. Gestations-Monat funktionsfähig und drainieren den Urin über die Sammlerohre in die Papillengänge, welche in ~8-10 Nierenkelche münden (Langman 1985). Ab diesem Zeitpunkt sezerniert der Fötus Urin in die Amnionhöhle, welcher oral wieder aufgenommen wird. Harnpflichtige Substanzen müssen daher über plazentären Rückfluss eliminiert werden. Die adulte Transport- und Konzentrierungskapazität wird im Alter von 18 Monaten erreicht.

In der Ratte beginnt die Entwicklung des Metanephros ab dem embryonalen Tag E12. Die letzte Nephrongeneration findet am postnatalen Tag P7 Anschluss an das Sammelrohr. Es folgt die weitere postnatale Reifung (4-8 Wochen), die sich durch Längenwachstum der Nephrone und Sammelrohre (Saxén 1987) und den Erwerb renaler Transporter und Transporte auszeichnet (Horster 2000, Satlin 1994, Schmitt et al. 1999).

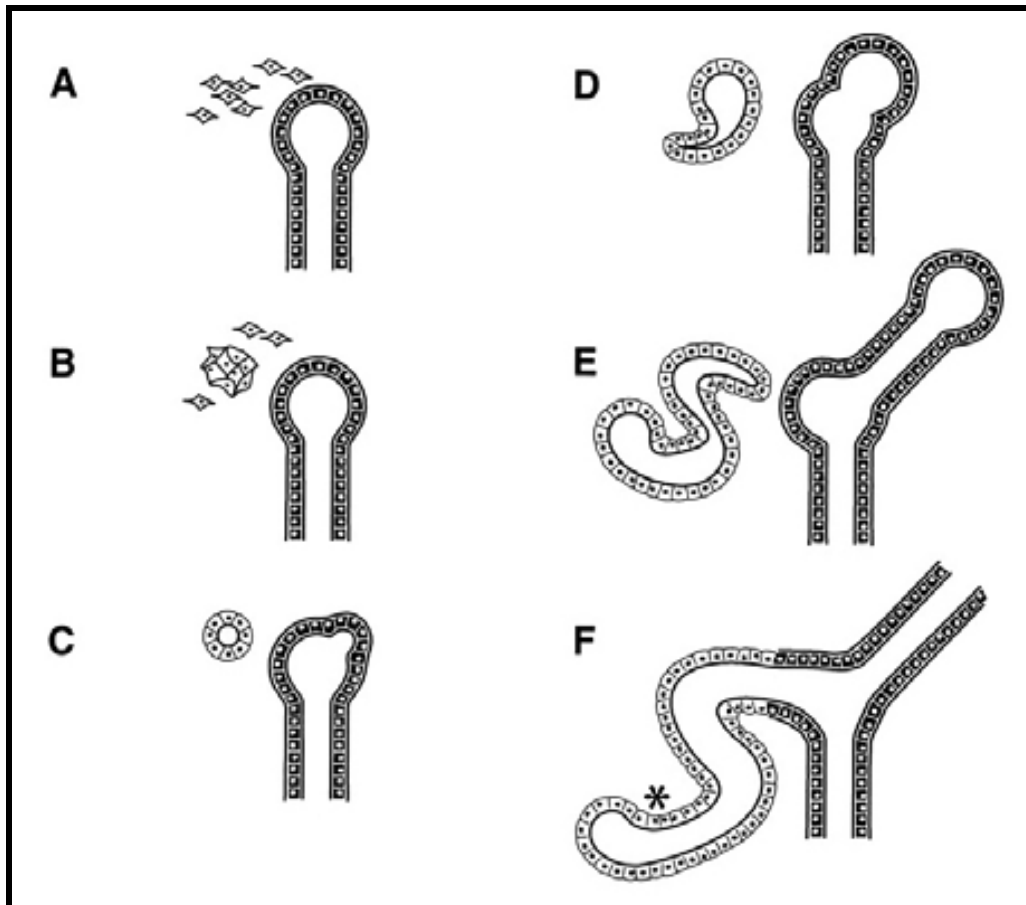
## 1.2.1 Nephron-Genese

Die Entwicklung des Nephrons aus dem Mesenchym erfolgt durch mesenchymal-epitheliale Transformation (MET). Hierbei induzieren sich die aussprossende Ureterknospe und das sie umgebende Mesenchym (metanephrogenes Blastem) gegenseitig (Horster et al. 1997, Horster et al. 1999, Quiao et al. 1995). Diese reziproke Induktion bedingt die dichotome Verzweigungs-Morphogenese des Sammelrohrepthels und die Differenzierung des induzierten Mesenchyms zum Nephron. Dieser Prozess läuft in der sog. Nephrogenen Zone ab. Hierbei lassen sich mehrere morphologische Stadien unterscheiden (Saxén 1987) **(zusammengefasst in Abb. 1.5)**. – Einzelheiten über das Signaling zwischen UB und Mesenchym und über die beteiligten Transkriptionsfaktoren siehe Horster et al. (1999), Stuart und Nigam (2000).

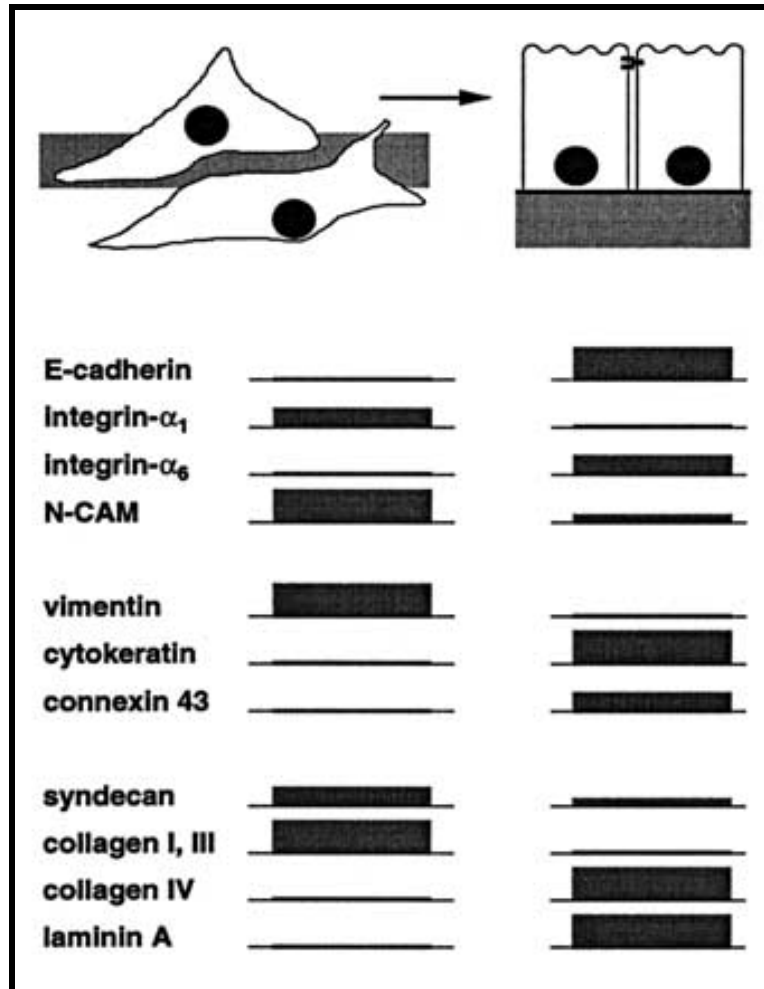
Während der mesenchymal-epithelialen Transformation (MET) wird der epitheliale Phänotyp erworben, der sich insbesondere durch die apiko-basolaterale Polarisierung auszeichnet. Im Rahmen von MET werden mesenchymale Marker-



Moleküle herunterreguliert (z.B. *Vimentin*, *Kollagen I und III*), und gleichzeitig epitheliale Marker erworben (z.B. *E-cadherin*, *Integrin- $\alpha 6$* , *Zytokeratin*, *Kollagen IV*, *Laminin A*) (Horster et al. 1999, Stuart und Nigam 2000) (**Abb. 1.6**).



**Abb. 1.5 – Morphologische Stadien der Nephron-Entwicklung.** *Hell:* Nephronanlagen und Nephronepithel. *Dunkel:* Ureterknospen (UB) und Sammelrohr. **A:** UB umgeben von metanephrogenem Mesenchym. **B:** Induktion und mesenchymal-epitheliale Transformation des metanephrogenen Mesenchyms (Stadium der *mesenchymalen Kondensation*). **C:** *Vesikel*-Stadium der Nephronanlage. **D:** *Komma-förmiger Körper*. **E:** *'S-förmiger Körper*. rechts: die nächste UB-Generation induziert parallel neue Nephron-Anlagen. **F:** Links: Anastomosen-Bildung zwischen S-förmigem Körper und UB. Der UB-abgewandte Pol des S-förmigen Körpers erfährt weiteres Längenwachstum und bildet die spätere Bowman'sche Kapsel. Dabei entstehen (*siehe Stern*) durch Vaskulogenese die Blutgefäße des zukünftigen Glomerulus (*siehe Barry et al. 1998*). Die glomerulären Gefäße finden dann Anschluss an die einwachsende Blutversorgung (Angiogenese, *siehe Saxén 1987, Simon et al. 1995*). Die adulten Tubulus-Segmente von Bowman'scher Kapsel bis einschließlich Distaler Tubulus Contortus (DCT) und Teile des Verbindungs-Segments (*connecting tubule / CNT*) gehen aus Anlagen des S-förmigen Körpers hervor (Schmitt et al. 1999). Das Sammelrohrepithel bildet die Kortikalen- und Medullären Sammelrohre. (Saxén 1987).



**Abb. 1.6 – Skizze der MET-assoziierten Veränderungen der Genexpression.** Die Balkengröße kodiert den relativen Grad der Expression von mRNA oder Protein einiger Extrazellulärer-Matrix-Proteine (ECM) und Zelladhäsions-Moleküle (CAM). Links ist das mesenchymale und rechts das epitheliale Stadium gezeigt.

## 1.2.2 Mögliche Epithelfunktionen in der Nephrogenese

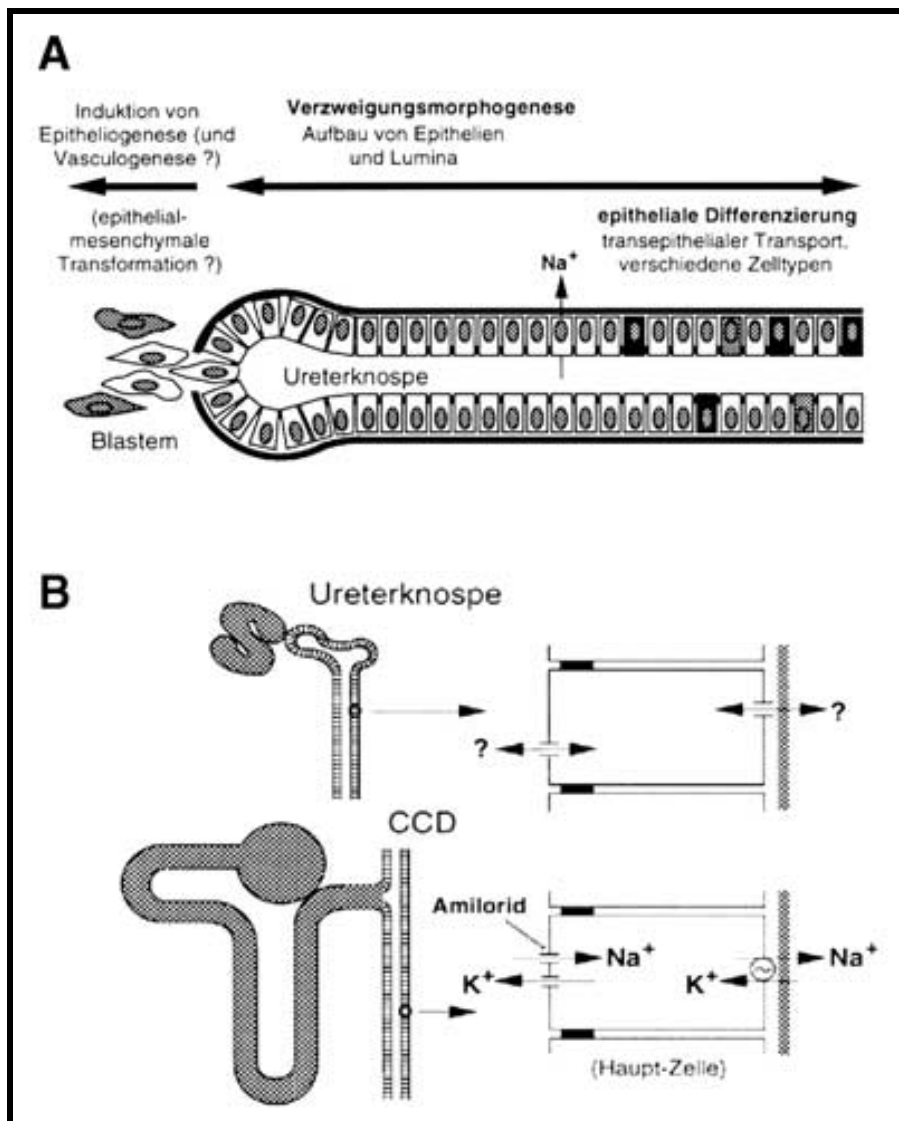
Die Sammelrohr- und Nephronepithelien haben während ihrer Entwicklung mehrere Aufgaben zu erfüllen: (1) Signaltransduktion, (2) Proliferation, (3) Differenzierung zu polarisierten Epithelien, (4) Aufbau und Aufrechterhaltung eines tubulären Lumens, (5) Erwerb adulter Transportproteine, die die Funktion der renalen Epithelzelle definieren.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bekannt, dass das Epithel der Ureterknospe nur unvollständig polarisiert ist (Minuth et al. 1987) und noch nicht die Morphologie des Kortikalen Sammelrohrs mit Haupt-, A- und B- Schaltzellen aufweist (Aigner et al. 1994, Evan et al. 1991, Lehtonen 1975). Wie die Übersicht in **Abb. 1.7** zeigt, lagen jedoch (bis auf erste Patch-clamp Untersuchungen an der Ureterknospe; Huber und Horster 1996) keine Daten über die Ausstattung des Nierenepithels mit Transportern und Ionenkanälen vor. Der zeitliche und räumliche Verlauf des Erwerbs solcher Proteine war kaum untersucht. Mit dieser Arbeit soll die Frage beantwortet werden, ob Ionenkanäle in entwicklungsrelevanten Zeitfenstern exprimiert werden. Dies würde dann auf eine entwicklungsspezifische Funktion (siehe oben) dieser Proteine deuten.

Ein Zusammenhang zwischen Ionenkanälen und Organentwicklung existiert z.B. bei der dichotomen Verzweigungsmorphogenese des Bronchialsystems der Lunge. Hier wird durch Cl<sup>-</sup>-abhängige Flüssigkeitssekretion das Lumen der Bronchien offengehalten und so die Größe des Bronchialbaumes determiniert (Souza et al. 1995). Ein Zusammenhang zwischen Zellwachstum und Ionenkanalktivität ist z.B. für K<sup>+</sup>-Kanäle dokumentiert (Wonderlin und Strobl 1996, Malhi et al. 2000, Ashcroft und Gribble 2000). Der teratogene Effekt von K<sup>+</sup>-Kanal-Aktivität-modifizierenden Substanzen im Mausmodell spricht für eine mögliche Rolle von K<sup>+</sup>-Kanälen in der Embryogenese (Smoak 1999).

Mutationen im Polycystin-1 oder -2 Gen verursachen die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD). Hierbei führt Flüssigkeitssekretion zur Bildung epithelialer Nierenzysten (Somlo und Ehrlich 2001). Das Zystenepithel exprimiert dauerhaft den (gegen Ende der Sammelrohr-Ontogenese herunterregulierten) Transkriptionsfaktor PAX-2 (Winyard et al. 1996) und weist einen den frühen Entwicklungsstadien der renalen Epithelien ähnlichen, de-differenzierten Phänotyp auf (u. a. apolare Expression der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase; Barisoni et al. 1995). Zystenepithelien exprimieren häufig *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) und H<sub>2</sub>O-Kanäle (Aquaporine) (Brill et al. 1996, Devuyst et al. 1996a), deren Aktivität mit der Größe der Zysten zu korrelieren scheint (Gattone et al. 1999). Die Untersuchung der ontogenetischen Ionenkanalexpression renaler

Epithelien könnte aus diesen Gründen eine Grundlage zum Verständnis des Mechanismus dieser renalen Fehlbildungen darstellen. Auch könnten Erkenntnisse über die Modalitäten der renalen Epitheldifferenzierung für das Verständnis von Nephroblastomen (Defekt des WT-1-Tumorsuppressors) von Bedeutung sein, die ebenfalls aus undifferenzierten renalen Epithelzellen bestehen (Dehbi et al. 1996).



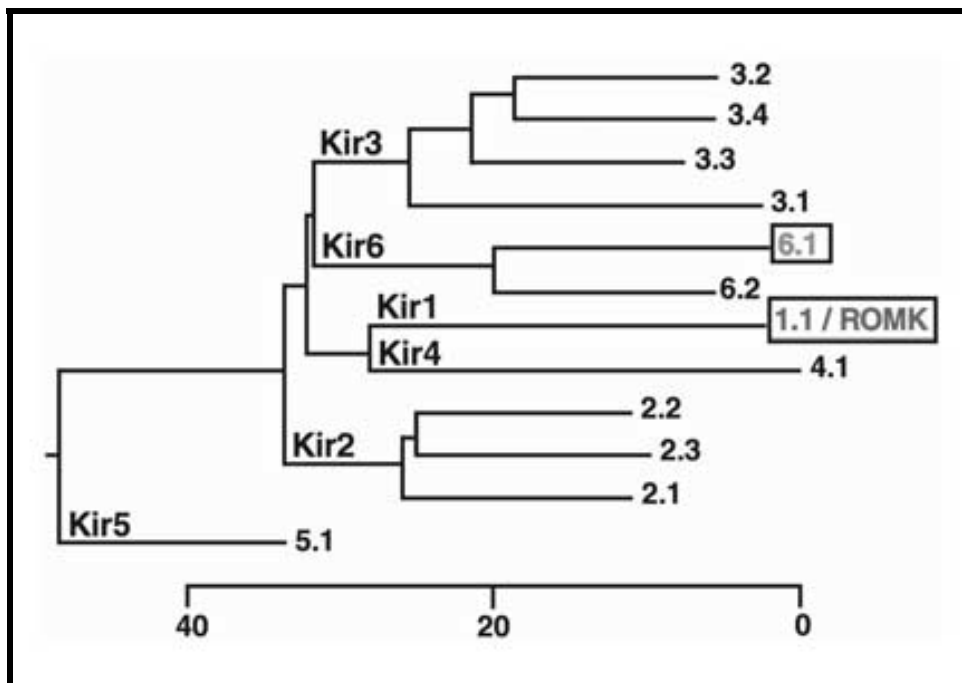
**Abb. 1.7 – Membraneigenschaften der Ureterknospenzelle.** **A:** Während der Differenzierung zu einem Zelltyp des reifen Sammelrohrs führt die Ureterknospenzelle verschiedene induktive und morphogenetische Funktionen aus. **B:** Aufgrund dieser spezifisch-embryonalen Funktionen sollte sich die Ionenkanal-Ausstattung von Ureterknospenzellen deutlich von derjenigen vektorieell transportierender reifer Sammelrohrzellen unterscheiden.

## 1.3 Untersuchte Ionenkanäle

Ionenkanäle sind porenformende Membranproteine, die Zellmembranen Durchlässigkeit für Ionen verleihen (Übersichtsartikel: Hebert 1998). Im folgenden werden die Ionenkanalsubtypen, deren Expression während der renalen Ontogenese hier untersucht wurde, kurz vorgestellt.

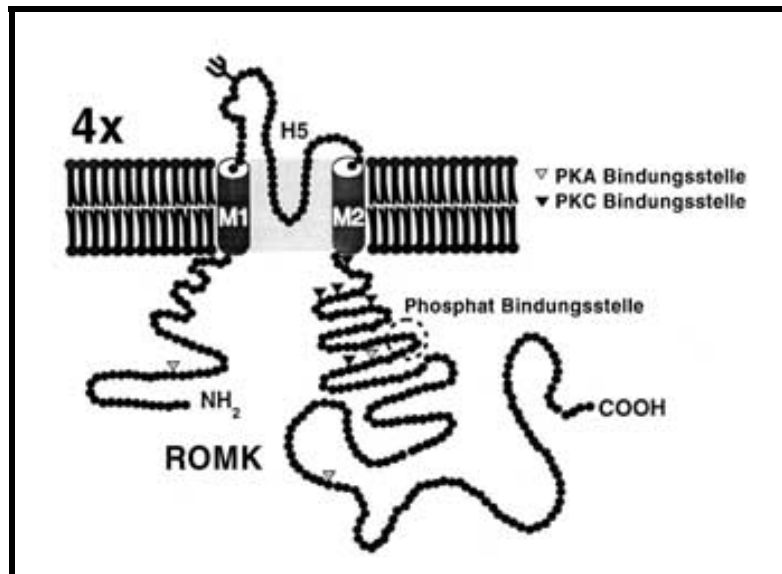
### 1.3.1 K<sup>+</sup>-Kanäle der Kir-Superfamilie

In dieser Arbeit wurde die ontogenetische Expression von Mitgliedern der Kir-Superfamilie der einwärtsgerichtenden (inwardly rectifying) K<sup>+</sup>-Kanäle untersucht (**Abb. 1.8**). Kir-Kanäle werden teilweise oder ausschließlich aus Multimeren der in Abb. 1.8 genannten Untereinheiten gebildet.



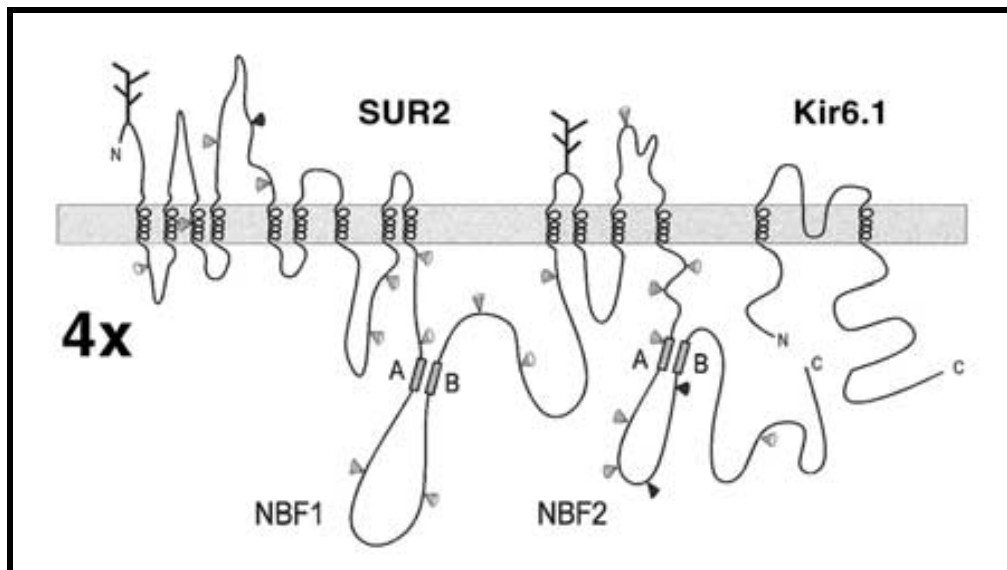
**Abb. 1.8 – Taxonomie der Kir-Superfamilie der einwärtsgerichtenden K<sup>+</sup>-Kanäle.** Umrahmt hervorgehoben sind Kir6.1 und ROMK (Kir1.1), deren Expression hier untersucht wurde. Der Balken zeigt die genetische Distanz (in Prozent) zwischen den einzelnen Proteinen an. Abbildung nach Nichols und Lopatin (1997). (Nicht gezeigt ist die Subfamilie Kir7.1; Derst et al. 2001).

Charakteristischerweise bilden vier Kir-Untereinheiten gleichen Typs gemeinsam einen Kanal, wie z.B. im Fall von ROMK (Kir.1.1), dem apikalen  $K^+$ -Kanal des aufsteigenden Teils der Henle'schen Schleife (TAL) und des Sammelrohrs der adulten Niere (Xu et al. 1997) (**Abb. 1.9**). ROMK-Kanäle besitzen eine mittlere Leitfähigkeit ( $\sim 35$  pS). Sie sind durch die Proteinkinase-A (PKA) aktivierbar und durch sauren pH und ATP-hemmbar (Giebisch 1998).



**Abb. 1.9 – Schema einer ROMK-Untereinheit in der Plasma-Membran.** Gezeigt ist eine von vier kanalbildenden Untereinheiten mit den zwei vermuteten Transmembrandomänen M1, M2 und dem porenbildenden Segment H5. Die Bindungsstelle für ATP sowie die Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase-A (PKA) und C (PKC) sind markiert. Abbildung adaptiert aus Giebisch (1998).

Im Gegensatz zu ROMK werden die sogenannten  $K_{ATP}$ -Kanäle heteromer aus vier Kir6.x-Untereinheiten und vier Untereinheiten des Sulfonylharnstoffrezeptors (SURx; Aguilar-Bryan et al. 1998, Dean et al. 2001) gebildet (**Abb. 1.10**). Kir6.x/SURx-Kanäle sind teilweise ATP-hemmbar (=  $K_{ATP}$ -Kanäle) und werden in unterschiedlicher Kombination (Kir6.1 oder Kir6.2 mit SUR1 oder SUR2) in vielen Geweben exprimiert (z.B. Pankreas, Herzmuskel, Gefäßmuskulatur; Ashcroft und Gribble 2000). Die pharmakologische Modulation der  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivität wird klinisch genutzt, z.B. steigert die Kanal-Inhibition durch Sulfonylharnstoffe die Insulinsekretion des Pankreas. Der Kanalöffner Minoxidil wird gefäßdilatierend bei arterieller Hypertonie und gegen Haarausfall eingesetzt (Ashcroft und Gribble 2000).

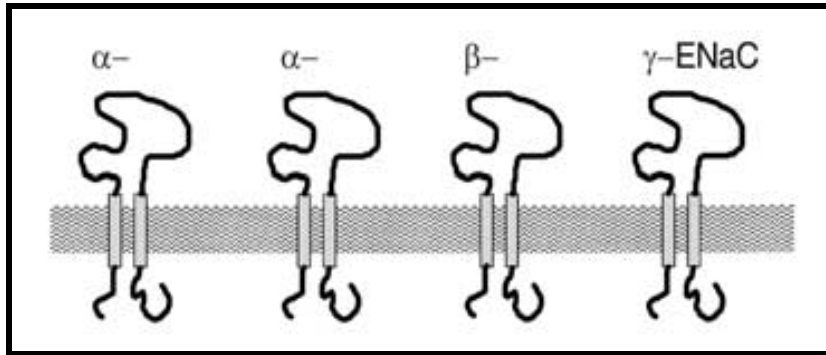


**Abb. 1.10** – Schema der  $K_{ATP}$ -Kanal-bildenden Untereinheiten SUR.x und Kir6.x. Funktionelle  $K_{ATP}$ -Kanäle sind Hetero-Oktamere aus vier Kir6 und vier SUR Untereinheiten. Der Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SUR) verfügt über 13 Transmembrandomänen und gehört zur Familie der ABC-Transporter, zu der auch der *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) und der *Multi Drug Resistance Receptor* (MDR) zählen. Abbildung adaptiert aus Aguilar-Bryan et al. (1998).

Funktions-modifizierende Mutationen in Kir-Kanälen sind mit einer Reihe von Krankheitsbildern assoziiert: der Funktionsverlust von ROMK führt klinisch zu einem renalen Kaliumverlust-Alkalose-Syndrom (Bartter-Syndrom); der Ausfall von pankreatischen Kir6.2-Untereinheiten führt zum Krankheitsbild der *Persistenten hyperinsulinämischen Hypoglykämie des Kindesalters* (PHHI) (Abraham et al. 1999).

### 1.3.2 Der epitheliale $Na^+$ -Kanal (ENaC)

Der apikale  $Na^+$ -Kanal der adulten Sammelrohr-Hauptzelle, ENaC, besteht aus den drei homologen Untereinheiten  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -ENaC in der Stöchiometrie ' $\alpha 2\text{-}\beta\text{-}\gamma$ ' (Firsov et al. 1998) (**Abb. 1.11**). Der Aldosteron-abhängige Einbau von ENaC in die apikale Plasmamembran dient der bedarfsabhängigen Regulation der  $Na^+$ -Rückresorption im Sammelrohr der adulten Niere (Alvarez de la Rosa et al. 2000).



**Abb. 1.11 – Schema der Untereinheiten des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals ENaC.** ENaC-Kanäle liegen vermutlich als Hetero-Tetramere der Stöchiometrie ' $\alpha_2\text{-}\beta\text{-}\gamma$ ' vor. Abbildung adaptiert aus Hummler und Horrisberger (1999).

Für ENaC sind sowohl *gain-of-function*- als auch *loss-of-function*-Mutationen beschrieben. Diese führen zur arteriellen Hypertonie mit Alkalose und Hypokaliämie im Rahmen des sog. Liddle-Syndroms, bzw. zum heterogenen Krankheitsbild des Pseudohypoaldosteronismus-Typ-1, der in schweren Fällen mit Hypotension, Hyponatriämie und Hyperkaliämie imponiert (Hummler und Horisberger 1999).

### 1.3.3 Die $\text{Cl}^-$ -Kanäle CFTR, CLC-2 und ICLn

In Epithelzellen sind  $\text{Cl}^-$ -Kanäle häufig an der Zell-Volumenregulation beteiligt, – eine Funktion, die auch besonders in Zellen mit hoher Teilungsrate von Bedeutung ist (Lang et al. 1998, Lang et al. 1998a). Überdies ist eine Rolle der  $\text{Cl}^-$ -Sekretion bei der Entwicklung des renalen Tubulussystems denkbar, wie dies von der Ontogenese des Bronchialsystems bekannt ist (Souza et al. 1995). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die  $\text{Cl}^-$ -Kanäle *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), CLC-2 und ICLn untersucht.

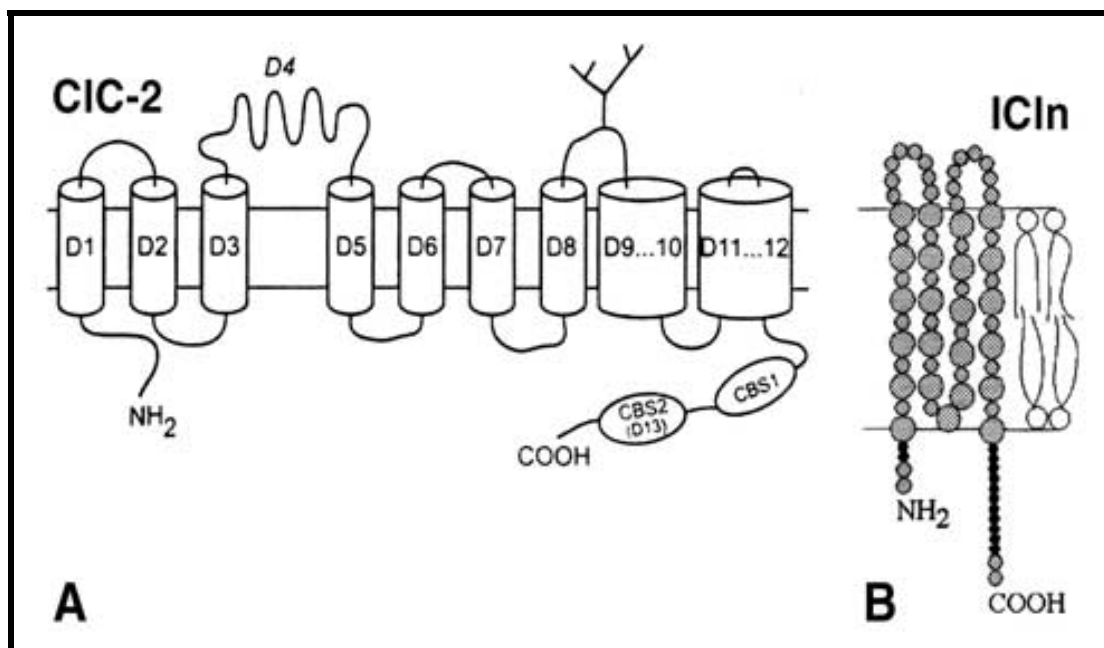
CFTR ist - wie der Sulfonylharnstoff Rezeptor (SUR) - ein Protein aus der Familie der ABC-Transporter und weist eine zu SUR (**Abb. 1.10**) analoge Sekundärstruktur auf (Sheppard und Welsh 1999). CFTR kann sowohl als  $\text{Cl}^-$ -Kanal als auch als ATP-Kanal wirken und führt bei Mutationen mit Funktionsverlust zum Krankheitsbild der Zystischen Fibrose, bei der Lungen-, Darm- und Pankreasfunktion durch eine erhöhte



Viskosität des Drüsensekrets gestört sind (Schwiebert et al. 1999). Adulte distale Tubuli und Sammelrohre exprimieren CFTR (Wilson 1999).

CLC-2 (**Abb. 1.12**) ist ein Mitglied der Superfamilie der spannungsabhängigen Cl<sup>-</sup>-Kanäle (Jentsch et al. 1999) und wird ubiquitär sowie besonders hoch während der Entwicklung des Bronchialepithels der Lunge exprimiert (Murray et al. 1995).

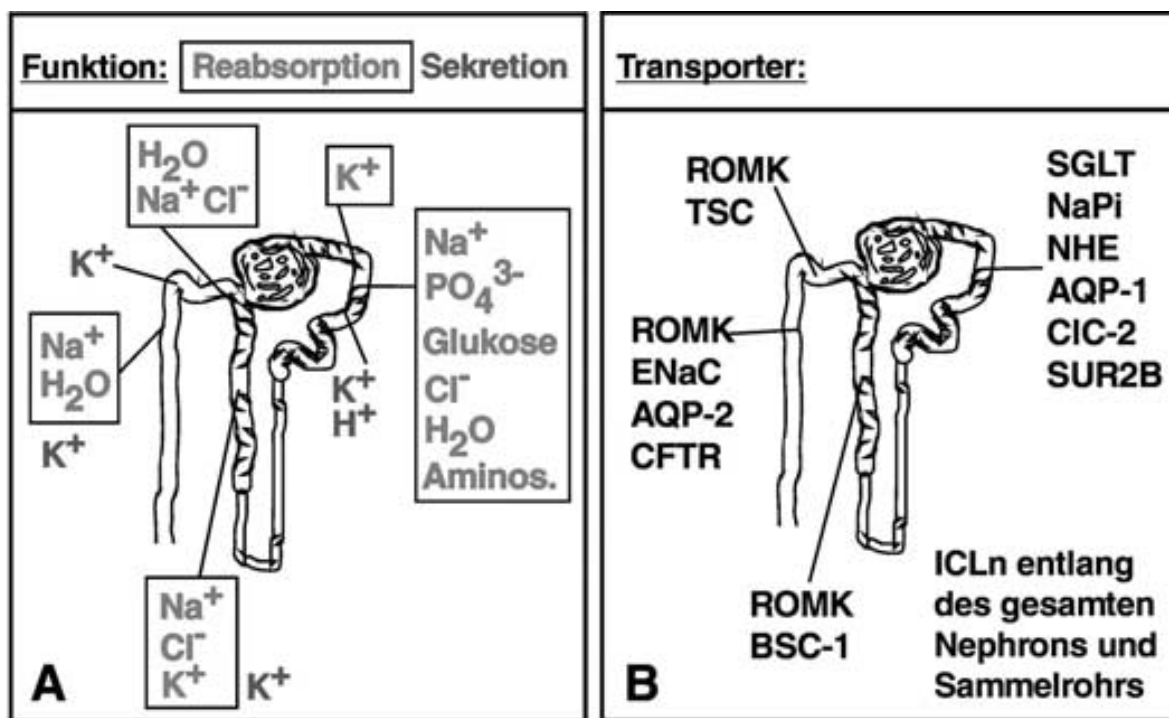
ICLn (**Abb. 1.12**) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das entweder durch Interaktion mit noch nicht identifizierten Partnern oder durch selbständige Bildung eines Cl<sup>-</sup>-Kanals eine Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit generiert, welche Charakteristika der typischen schwellungsinduzierten Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeiten aufweist (Fürst et al. 2000). ICLn ist ferner für das zelluläre Überleben essentiell und interagiert mit Proteinen der Zell-Zyklus-Regulation (Pu et al. 2000).



**Abb. 1.12 – Skizze der Sekundärstruktur der Cl<sup>-</sup>-Kanaluntereinheiten CLC-2 und ICLn.** Die Familie der CLC-Kanäle umfasst derzeit 13 bekannte Mitglieder, die vermutlich jeweils durch Dimerisierung einen Cl<sup>-</sup>-Kanal bilden (Jentsch et al. 1999). Die Funktion von ICLn-Protein ist nicht endgültig geklärt – es handelt sich entweder um einen Regulator von schwellungsaktivierten Cl<sup>-</sup>-Kanälen oder um einen eigenständigen Cl<sup>-</sup>-Kanal, der dann vermutlich ein Dimer wäre (Fürst et al. 2000).

## 1.4 Ionenkanal- und Transporterexpression der adulten Niere

Mit der ontogenetischen Entwicklung müssen die Nierenepithelien die für die adulte Funktion notwendigen Transportmechanismen für Wasser, Elektrolyte und Metaboliten ausbilden. **Abb. 1.13** fasst schematisch die Lokalisation wichtiger reabsorptiver und sekretorischer Funktionen sowie wichtiger apikaler Ionenkanäle und Transporter zusammen. Die **Einteilung und Nomenklatur der einzelnen Tubulus-segmente wurde in Kap. 1.2, Abb. 1.4 B** eingeführt. Weitere Ausführungen über das Funktionsprinzip der Niere und die Physiologie der Nephron- und Sammelrohr-segmente siehe Rose und Renke (1994) sowie Giebisch (1998).



**Abb. 1.13 – Transportfunktionen, apikale Transporter und apikale Ionenkanäle der adulten Niere.** **A:** Funktionen der einzelnen Tubulusabschnitte. Reabsorbierte Ionen und Metabolite sind umrahmt dargestellt, sezernierte Ionen ohne Rahmen. **B:** Lokalisation am tubulären Transport beteiligter Moleküle entlang des Tubulus. Abkürzungen: (SGLT) sodium glucose transporter/ $\text{Na}^+$ -Glukose-Cotransporter; (NaPi)  $\text{Na}^+$ -Phosphat-Cotransporter; (SUR2B) Sulfonylharnstoff-Rezeptor-2B; (NHE)  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauscher; (BSC-1/NKCC2) furosemidsensitiver- $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Cotransporter; (TSC) thiazidsensitiver- $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$ -Cotransporter; (AQP-1; AQP-2) Aquaporine /  $\text{H}_2\text{O}$ -Kanäle. (Paillard 1997, Takata 1996, Werner et al. 1998, Kwon et al. 2001, Beesley et al. 1999, Hebert 1998a).

## 1.5 Ziel und Hintergrund der Arbeit

**Es war das Ziel dieser Arbeit, (i)** die zeitliche und örtliche Expression von Ionenkanälen während der ontogenetischen Entwicklung der Säugetiere auf Messenger-RNA und Proteinebene zu charakterisieren. Dazu wurde das Expressionsmuster von Kandidatengenen in embryonalen und postnatalen Nierenepithelien von Ratte und Maus untersucht. **(ii)** Expressionsverläufe tragen zur besseren Charakterisierung der einzelnen funktionellen Phasen der Nephrogenese bei, z.B. sekretorisch, reabsorptiv, proliferativ, adulte Epithelfunktion. Dies gilt insbesondere in Zusammenschau mit bestehenden anatomischen und funktionellen (elektrophysiologischen) Daten. **(iii)** Im Anschluß können vermutete entwicklungs-spezifische Funktionen direkt experimentell weiter überprüft werden.

Seit den morphologischen Studien von Huber vor fast 100 Jahren sind die anatomischen Phasen der Ontogenese der permanenten Niere (Metanephrogenese) im Säugetier einschließlich Mensch genauestens charakterisiert worden (Huber 1905, Peter 1927, Osathanondh und Potter 1966, Osathanondh und Potter 1966a, Oliver 1968, Potter 1972, Dørup und Maunsbach 1982). Die Induktionsexperimente von Grobstein (Grobstein 1953, Grobstein 1955, Grobstein 1956) markieren den Beginn der entwicklungsbiologischen Forschung auf dem Gebiet der Niere. Bis heute sind zahlreiche Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle identifiziert worden, deren Störung oder Fehlen zur Dymorphogenese der Niere führt (Horster et al. 1999, Stuart und Nigam 2000).

Gleichzeitig war jedoch zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur sehr wenig über die Membraneigenschaften und zellulären Transportfunktionen des sich entwickelnden Nierenepithels bekannt. Elektrophysiologische Daten lagen nur über das Sammelrohrethel vor: aus embryonalen und postnatalen Ureterknospen (Huber und Horster 1996) sowie über die postnatale Reifung des Sammelrohrs (Huber und Horster 1996, Satlin und Palmer 1996, Satlin und Palmer 1997). An für Transportfunktionen relevanten Molekülen waren nur CFTR und Aquaporine nachgewiesen worden (Devuyst et al. 1996, Devuyst et al. 1996a).

Es ist wahrscheinlich, dass in der Nephrogenese zelluläre Transportfunktionen – ähnlich wie in der Lunge (Souza et al. 1995) – einen wichtigen morphogenetischen Faktor darstellen. Sie sind potentielle Effektormoleküle von Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen. Fehlregulationen von zellulären Transportmechanismen können mit Organfehlbildungen der postnatalen Periode, z.B. den polyzystischen Nierenerkrankungen assoziiert sein (Braun und Huber 2002, Wilson 1999).

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Hormone und Enzyme

3',-5'-zyklisches Adenosin-Monophosphat	(Sigma, Deisenhofen)
Acrylamid	(Biorad, München)
AEC-Chromogen	(Biogenex, San Ramon, Cal., USA)
Agarose <i>low-melting</i>	(Biozym, Oldendorf)
Agarose	(Biozym, Oldendorf)
Aldosteron	(Sigma, Deisenhofen)
Avidin-konjugierte Peroxidase	(Biogenex, San Ramon, Cal., USA)
Biotin-Avidin-blocking Kit	(Vector, Burlingame, Cal., USA)
Borsäure	(Merck, Darmstadt)
Bromphenolblau	(Sigma, Deisenhofen)
dNTP-mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	(Promega, Freiburg)
DTT	(Life Technologies, Eggenstein)
Eisessig	(Sigma, Deisenhofen)
Ethidiumbromid	(Promega, Freiburg)
fetales Kälberserum (FCS)	(Sigma, Deisenhofen)
flüssiger Stickstoff	(Linde, Pullach)
Formaldehyd	(Sigma, Deisenhofen)
Forskolin	(Sigma, Deisenhofen)
Glibenclamid	(Sigma, Deisenhofen)
Glutamin	(Sigma, Deisenhofen)
Glutaraldehyd	(Sigma, Deisenhofen)
Glycerol	(Merck, Darmstadt)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(Merck, Darmstadt)

---

HEPES	(Sigma, Deisenhofen)
Humantransferrin	(Sigma, Deisenhofen)
KCl	(Sigma, Deisenhofen)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Sigma, Deisenhofen)
Magermilchpulver	(handelsübliches Lebensmittel)
Methanol	(Merck, Darmstadt)
MgCl <sub>2</sub> (1.5 mM)	(Sigma, Deisenhofen)
molekularer Größenmarker (pUC Mix) <sup>®</sup>	(MBI Fermentas, St.Leon-Rot)
Na <sup>+</sup> -Selenit	(Sigma, Deisenhofen)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	(Sigma, Deisenhofen)
NaCitrat	(Sigma, Deisenhofen)
NaCl	(Sigma, Deisenhofen)
NaHCO <sub>3</sub>	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	(Sigma, Deisenhofen)
NBT/BCIP-Substrat	(Sigma, Deisenhofen)
Nitrozellulose-Membranen	(Schleicher, Dassel)
oligo (dT) <sub>12-18</sub>	(Promega, Freiburg)
Paraffin	(Roth, Karlsruhe)
Penicillin	(Sigma, Deisenhofen)
Pinacidil	(Sigma, Deisenhofen)
Reverse Transkriptase SuperScript II <sup>®</sup>	(Life Technologies, Eggenstein)
Rinder-Hypophysenextrakt (BPE)	(Sigma, Deisenhofen)
Rinderserumalbumin (BSA)	(Sigma, Deisenhofen)
RNAsin	(Promega, Freiburg)
Rotihistol <sup>®</sup>	(Roth, Karlsruhe)
Streptomycin	(Sigma, Deisenhofen)
Taq-Polymerase <sup>®</sup>	(Sigma, Deisenhofen)
TEMED	(Biorad, München)
Tri-Reagenz <sup>®</sup>	(Sigma, Deisenhofen)
TRIS	(Sigma, Deisenhofen)
Tris-HCl	(Sigma, Deisenhofen)
Tween-20	(Sigma, Deisenhofen)
Vistragreen <sup>®</sup>	(Amersham, Braunschweig)

## 2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Agarose-Gel:	Agarose (2%) in TBE-Puffer (siehe unten)
Low-melting-Agarose-Gel:	Low-melting-Agarose (1.5%) in TBE-Puffer (siehe unten)
DNA-Ladepuffer (6 x):	(MBI-Fermentas, St.Leon-Rot)
Acrylamid-Gel (5%):	Acrylamid und TEMED im Verhältnis 19:1, TBE-Puffer (siehe unten)
DMEM-Medium:	Dulbecco's modified eagle medium (GIBCO, Eggenstein)
Elektrophorese-Laufpuffer:	TAE/Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50 x): 242 g TRIS, 57.5 ml Eisessig, 100 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0), add 1 liter H <sub>2</sub> O dest
Karnovsky-Lösung:	5% Glutaraldehyd, 4% Formaldehyd, Na-Phosphat-Puffer/pH 7.2 (Sigma, Deisenhofen), in wässriger Lösung
Na-Citrat-Puffer:	NaCitrat 10 mM in H <sub>2</sub> O
Nephron-Kultur-Medium:	Ham-F12-/ DMEM-Medien (beide GIBCO, Eggenstein) gemischt 1:1, NaHCO <sub>3</sub> (1,75 g/l), Humantransferrin (5µg/ml), Glutamin (0,02 mM), Na <sup>+</sup> -Selenit (5 x 10 <sup>-8</sup> M), HEPES (10 mM), BPE (50 µg/ml), FCS (1 %), Penicillin (100,000 IU/liter), Streptomycin (100 mg/liter)
PBS:	phosphatgepufferte Salzlösung (Sigma, Deisenhofen): 135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 3.2 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O, 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.4

---

PCR-Reaktionspuffer:	(Sigma, Deisenhofen)
Peroxidase-Lösung:	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2%)-Lösung in Methanol
Phenol/Chloroform-Lösung pH 7.5:	(Sigma, Deisenhofen)
Reverse-Transkriptase-Puffer:	(Life Technologies)
SDS-Puffer:	Natriumdodecyl-Sulfat-Puffer: 100 mM Tris-HCl, 200 mM Dithiothreitol/DTT, 4 % Natriumdodecyl-sulfat/SDS, pH 6.8, 20 % Glycerol, 0.025 % Bromphenolblau
TBS-Puffer:	Tris-gepufferte Salzlösung: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5
TBE-Puffer:	Tris-Borat-EDTA-Puffer (10 x): 540 g TRIS, 275 g Borsäure, 200 ml EDTA 0,5 M (pH 8.0), add 1 liter H <sub>2</sub> O
TTBS-Puffer:	Tween-Tris-gepufferte Salzlösung: 0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.1 % Tween-20, pH 7.4
Western-Blot-blocking-Puffer:	10 % Magermilch in PBS 0.5 % Tween-20

### 2.1.3 Oligonukleotidprimer

Die verwendeten PCR-Oligonukleotidprimer (**Tabelle 1**) wurden mit Hilfe der online Computer-Software 'Primer 3' ausgewählt (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) oder aus der Literatur übernommen und von Life Technologies, Paisley, Schottland synthetisiert.

**Tabelle 1 – Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer (Legende siehe Umseite). ►**



Primer		Sequenz	Prod. In Bp	Genbank #	Position	Ann.- Temp.
<b>K<sup>+</sup> -Kanäle</b>						
Kir6.1-I- (Ratte)	S AS	ATT GAT AAG CGT AGC CCC CT CAG AGA ATT CTG GTG CGA CA	330	D42145	990-1319	54°C
Kir6.1-II- (human)*	S AS	TGG CTG CTC TTC GCT ATC AT TTT CTT GAC CAC CTG GAT GC	447	NM_004982	520-966	60°C
SUR2-I- (Ratte)	S AS	TGA AAA TAA CCT GAA GCC CG CCT GGC AGA GAT TTG ACC AT	345	D83598	4221-4565	54°C
SUR2-II- (human)	S AS	ACA TTG CCT ACT TAT TTC TCTC AGA GAT TTG ACC ATA TTC TTCA	685	NM_020297	3617-4301	60°C
ROMK1#	S AS	CAA TGC AAG TAA ATG TCA TT GGC GCA CTG TTC TGT CAC AA	574	X72341	38-611	52°C
ROMK2 #	S AS	TTT ACC CCA GCA ATC CAT GA Identisch mit ROMK1-AS	447	L29403	114-560	57°C
ROMK3 #	S AS	GGC AGT ACA GAC AAT GGT GT GTA CCT CCA TTT CAG GTC CA	269	S78155	85-353	52°C
<b>Rezeptor</b>						
V2R	S AS	GTC ACC TGG ATT GCC TTG AT CCC AGC ATA GCA CGT AGA CA	238	Z22758	616-853 **	62°C
<b>Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup> -Kanäle</b>						
α-EnaC	S AS	AAC TCT CTG CCG GCT ACT CA CAT CTC CAC CAC AGA GAG CA	254	D42145	1616-1869	56°C
β-EnaC	S AS	CTG TGT CTT CCA GCC TGA CA TGA CCC TAT GAA CCC CTC AG	313	X77932	1827-2139	56°C
γ-EnaC	S AS	CAG TTG GTT GCT GAC CTC AA AGG CTG GTG TTT GTT ATG CC	300	X77933	2476-2775	56°C
CFTR	S AS	CGC AGG TTC TCA GTG GAC GAT GCC CCT CAA CCA GAA AAA CCA GCA CGC	607 462	M89906	556-1162	62°C
CLC-2	S AS	CAA GCC TCC AGG AAG GTA C TCC CAA TGA GTC TGC CAA TG	372 309	X64139	2306-2680	56°C
ICLN	S AS	ATG TCA TGG TGA ATG CCA GA TAA TCT CTC CAG CGT GGC TT	326	D17698	259-584	56°C
<b>Housekeeper</b>						
β-Aktin-I- (Ratte) §	S AS	AAC CGC GAG AAG ATG ACC CAG ATC ATG TTT AGC AGC CGT GGC CAT CTC TTG CTC GAA GTC	351	X00351	384-834	56°C
β-Aktin-II- (human) ¶	S AS	GGA AAT CGT GCG TGA CAT T TCT GCT GGA AGG TGG ACA G	446	XM_037235	691-1136	60°C

**Tabelle 1 – Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer.** Prod. = Länge des amplifizierten PCR-Produkts. Ann.-Temp. = Annealing Temperatur. V2R = Vasopressin-Typ-2-Rezeptor. \* Kir6.1-II-(human) nach Huber et al. (2000). # ROMK1-3 nach Boim et al. (1995). §  $\beta$ -Aktin-I-(Ratte) nach Kretzler et al. (1996). ¶  $\beta$ -Aktin-II-(human) nach Gamper et al. (2002). \*\* Position auf dem aus der Genomsequenz abgeleiteten mRNA-Molekül. SUR2-Primer amplifizieren ein mRNA-Segment, das allen bekannten SUR2-Splice-Varianten gemeinsam ist (siehe Diskussion Kap. 4.2.1).

## 2.1.4 Antikörper und Vektoren

### Primäre Antikörper

Kir6.1-Antikörper: Gegen Ratte/Maus-Kir6.1, gezogen in Kaninchen (siehe Kap. 2.2.3.1) (Prof. Veh, Anatomisches Institut der Charité, Berlin)

ROMK-Antikörper: Gegen Ratte/Maus-ROMK, gezogen im Kaninchen (s. Kap 2.2.3.2) (Alomone Labs, Jerusalem, Israel)

### Detektionsantikörper

Biotinylierter Anti-Kaninchen-IgG Antikörper: (Biogenex, San Ramon, Cal., USA)

Tamm-Horsfall-Protein-Antikörper: gegen Ratten-Tamm-Horsfall-Protein, gezogen im Schaaf (Biotrend, Köln)

Biotinylierter Anti-Schaaf-IgG Antikörper: gezogen im Kaninchen (Rockland, Gilbertsville, Pa., USA)

Alkalische Phosphatase: Alkalische Phosphatase, konjugiert an Anti-Kaninchen-IgG, gezogen in der Ziege (Vector, Burlingame, Cal., USA)

## Expressionsvektoren

Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)	(Qiagen, Düsseldorf)
Glutathion-S-Transferase (GST)	(Pharmacia Biotech, Schweden)
pScreen 1b	(Novagene, Madison, Wis., USA)

## 2.1.5 Zelluläres Material und Tiere

HEK293-Zellen	(Prof. F. Lang, Tübingen)
Kaninchen, New Zealand white rabbit	(Prof. R. Veh, Berlin)
Mäuse, Stamm CD-1	(Charles River, Braunschweig)
Ratten, Stamm <i>Sprague-Dawley</i>	(Charles River, Braunschweig)
Rattenschwanz-Kollagen-Matrix	(Eigenpräparation)

## 2.1.6 Geräte, Software und Sonstiges

### Geräte und Software

Automat für medizinische Routine-Histologie	(Ludwig-Kators, München)
ELISA-Leser	(Beckton Dickinson, Heidelberg)
FACS-Analysegerät, Calibur	(Beckton Dickinson, Heidelberg)
Gelkammern Protean Mini <sup>®</sup>	(Biorad, München)
ImageQuant <sup>®</sup> -Software	(Molecular Dynamics, Krefeld)
Klingen-Mikrotom	(Leitz, Wetzlar)
Kühlzentrifuge	(Eppendorf, Hamburg)
Kunstlichtfilmen Kodak T-160	(Kodak, Stuttgart)
Lichtmikroskop Zeiss DM-1	(Carl Zeiss, Oberkochen)

---

Mikrorührstab ( <i>Ultra Turrax</i> )	(Schubert Laborbedarf, Schwandorf)
Spannungsquelle für Elektrophorese	(Biorad, München)
Statistikprogramm InStat	(Graph Pad, San Diego, Cal., USA)
Statistikprogramm Origin	(Microcal, Northampton, Mass., USA)
Storm 840 Fluophosphor Imager	(Molecular Dynamics, Krefeld)
Tabellenkalkulation Excel	(Microsoft)
Thermocycler (DNA Engine PTC 200)	(MJ-Research, Biozym, Oldendorf)
Tischzentrifuge	(Eppendorf, Hamburg)
Ultraschallzerkleinerer (Supersonic)	(Schubert Laborbedarf, Schwandorf)
UV-Lichtquelle zur Visualisierung von DNA-Banden	(handelsüblich)

## Sonstiges

Deckgläser	(Schubert Laborbedarf, Schwandorf)
DNA-Purifikations-Säule	(Quiagen, Düsseldorf)
Silikon-beschichtete Objektträger	(Schubert Laborbedarf, Schwandorf)
Zell-Kulturschalen (30 mm)	(Nunc, Wiesbaden)

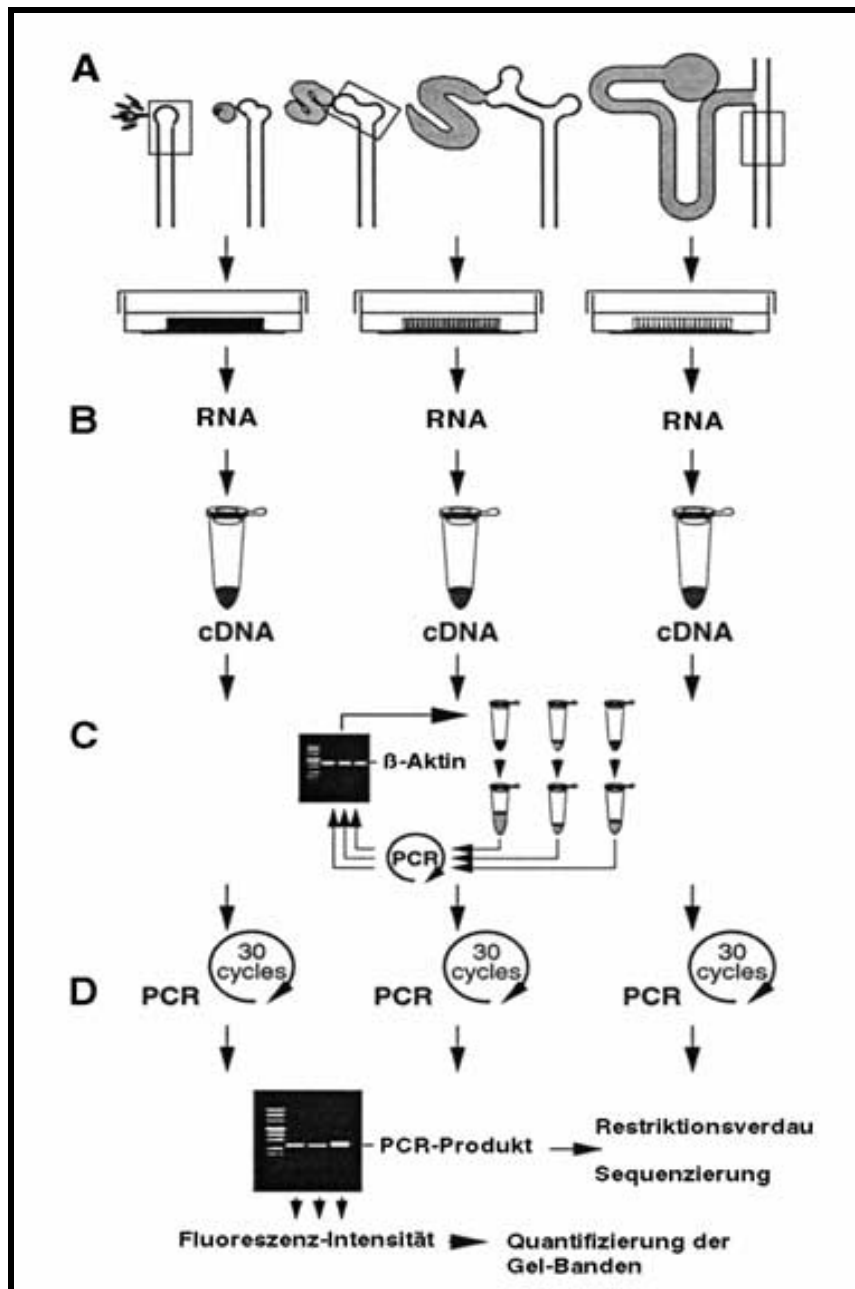
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Sammelrohrepithel-Monolayer-Primärkultur

##### Einführung

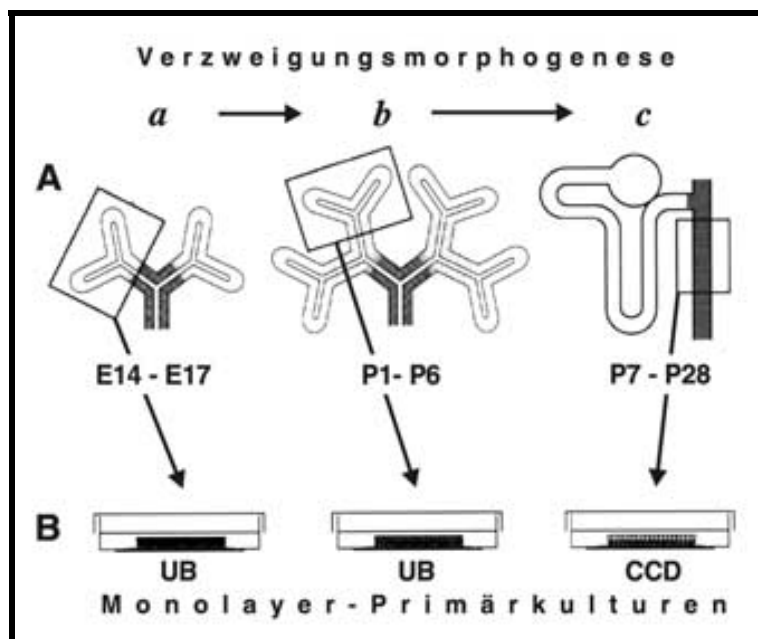
In dieser Arbeit wurde der zeitliche Verlauf der Expression von Ionenkanal-mRNA im Sammelrohrsystem untersucht. Das verwendete Analysemodell ist in **Abb. 2.1** zusammengefasst. Ureterknospen (UB) und Sammelrohrepithelien wurden aus Rattennieren disseziert und zur Vermehrung des Ausgangsmaterials in Monolayer-Primärkultur gebracht (**A**). RNA wurde isoliert und cDNA hergestellt (**B**). Die cDNA-Ausgangsmengen verschiedener Entwicklungsstadien wurden durch wiederholte PCR für den Housekeeper  $\beta$ -Aktin verglichen und mittels Verdünnung aneinander angepasst (**C**). Mit vergleichbaren Proben wurden Ionenkanal-spezifische PCR-Reaktionen durchgeführt, quantifiziert und statistisch ausgewertet (**D**).



**Abb. 2.1 – Schema der Analyse der Ionenkanal mRNA-Expression in Ureterknospen und Sammelrohrepithelien unterschiedlicher Entwicklungsstufen.** **A:** Ureterknospen (E14 bis P6) und Sammelrohrepithel (P7 bis P28) wurde aus Rattennieren disseziert und in Monolayer-Primärkultur gebracht. **B:** Gesamt-RNA wurde isoliert und mRNA in cDNA revers-transkribiert. **C:** cDNA-Ausgangsmengen verschiedener Entwicklungsstadien wurden durch wiederholte PCR für den Housekeeper  $\beta$ -Aktin verglichen und mittels Verdünnung aneinander angepasst. **D:** Mit vergleichbaren Proben wurden Ionenkanal-spezifische PCR Reaktionen durchgeführt. Die erhaltenen Produktmengen wurden mittels Fluoreszenzmesung der Gel-Banden quantifiziert und statistisch ausgewertet.

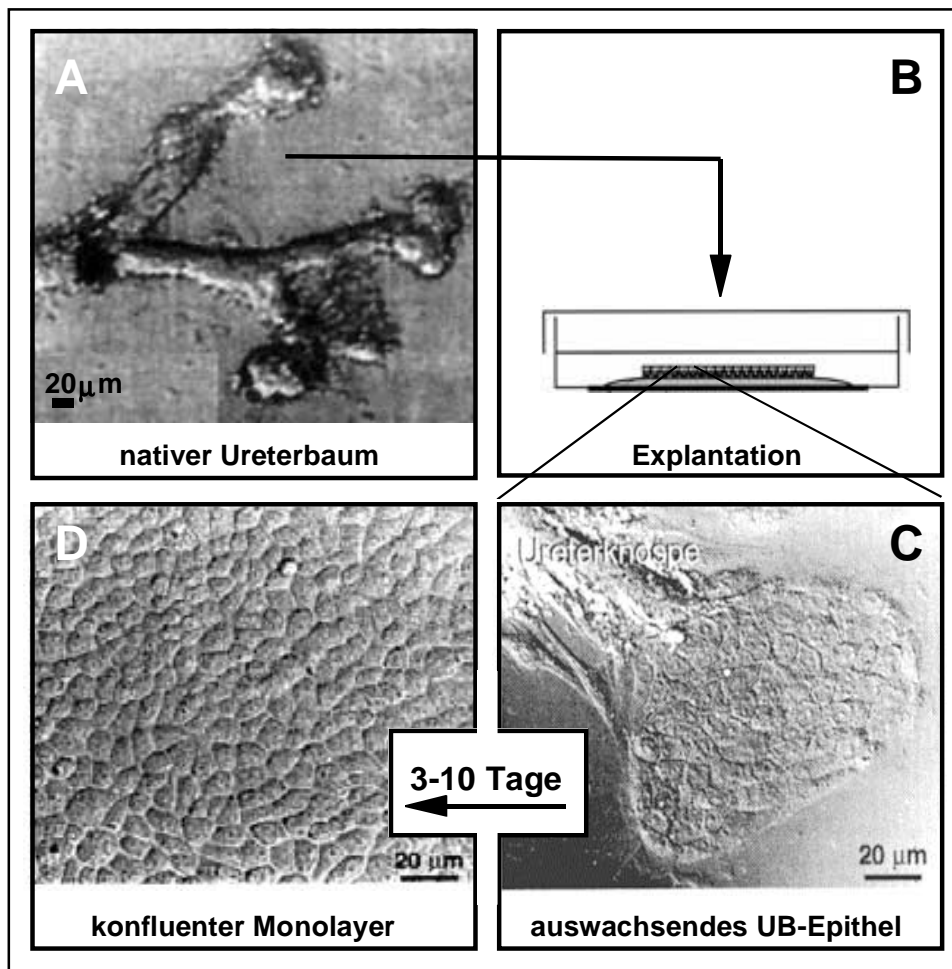
## Sammelrohrepithel-Monolayer-Primärkulturen

Wie in **Abb. 2.2** schematisch dargestellt, wurden jeweils die äußersten (= jüngsten) UB (E14-P6) inklusive ihrer Stämme, bzw. subkapsuläre Kortikale Sammelrohre (P7-P28) aus Rattennieren disseziert und vom Mesenchym befreit. Nach der Dissektion in PBS-Lösung wurden die Epithelien auf Kulturschalen (30 mm) übertragen, in deren Mitte sich eine Rattenschwanz-Kollagen-Matrix (10 mm Durchmesser, 10 µm Dicke) befand. 5-8 Tubuli mit aufgerissener basaler Zell-Lamina wurden mit Hilfe einer Pinzette an die Matrix geheftet und Nephron-Kultur-Medium (siehe Kap. 2.1.2) hinzugegeben. Auswachsende Zellen formten konfluente Monolayer von 5 mm Durchmesser binnen 1-3 Tagen (E14-P6), bzw. 3-10 Tagen (> P7). 24 h vor einer RNA-Präparation wurde das Nephron-Kultur-Medium durch ein Medium ersetzt, welches 1 µM Aldosteron anstatt FCS enthielt. **Abb. 2.3** zeigt mikroskopische Aufnahmen eines dissezierten Ureterbaums und von Sammelrohrepithel-Monolayer-Kulturen.



**Abb. 2.2 – Präparation von Ratten-Sammelrohrepithel in Monolayer Primärkulturen.**

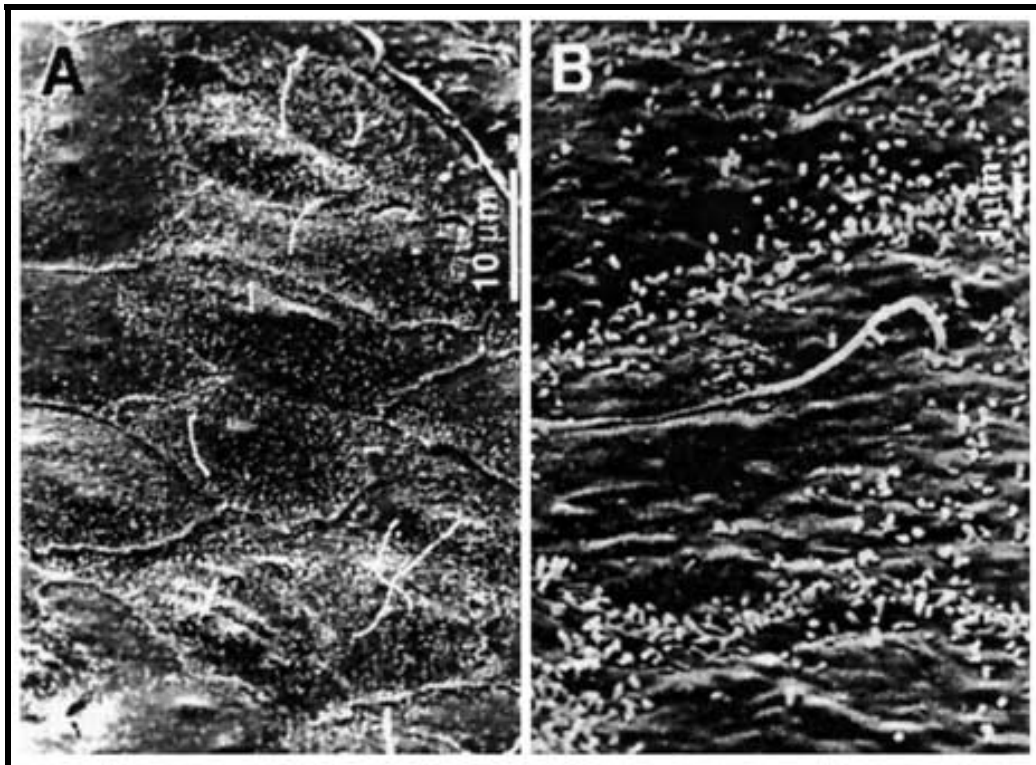
Jeweils die äußersten (= jüngsten) Ureterknospen der Stadien E14 – P6 wurden (inklusive ihrer Stämme bis zur vorangegangenen Teilungsstelle) disseziert und auf eine Kollagen-Matrix übertragen, um dort ein Monolayer auszubilden. In den Stadien P7-P28 wurden in gleicher Weise die Zellen Kortikaler Sammelrohre in Kultur gebracht.



**Abb. 2.3 – Zellmorphologie der Monolayer-Primärkulturen.** Lichtmikroskopische Aufnahmen. **A:** E17 Ureterbaum mit Ureterknospen direkt nach der Dissektion. **B:** Aus einer explantierten Ureterknospe auswachsendes Ureterknospen-Sammelrohrepithel. **C:** Bildung eines konfluenten Monolayers.

Konfluente Zell-Monolayer der embryonalen, perinatalen und postnatalen Stadien bis P21 wiesen durchgehend eine Hauptzell ähnliche Morphologie (Tisher und Madsen 2000) auf (Huber und Horster 1996) (**Abb. 2.4**). *In vivo* enthalten adulte Kortikale Sammelrohre neben Hauptzellen auch bis zu 30% Schaltzellen (engl. *intercalated cells*; siehe Kap. 1.4). Schaltzellen wurden in keinem Stadium der Sammelrohrepithel-Monolayer-Primärkulturen bei P21 beobachtet (Huber und Horster 1996). Kulturen der Stadien P21-P28 wiesen zu einem geringen Prozentsatz Zellen vom Schaltzelltyp auf (Huber und Horster 1996).





**Abb. 2.4 – Apikale Oberflächenmorphologie von Monolayer Primärkulturen. Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen. A:** Ureterknospene epithel (P1) **B:** Kortikales Sammelrohre epithel (P14). Kulturen der Stadien E17 (nicht gezeigt), P1 und P14 weisen stets nur einen Zelltyp auf, der durch seinen leichten Mikrovillussaum und zentrale Zilien dem Hauptzell-Typ des Kortikalen Sammelrohrs gleicht.

### 2.2.1.2 *Forskolin*-Stimulation von Sammelrohre epithel-Primärkulturen

Um die ROMK-mRNA-Expression von Ureterknospene-Epithel in Abhängigkeit von intrazellulärem 3',-5'-zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) zu untersuchen, wurden E17 Monolayer-Primärkulturen wie folgt mit der cAMP-Spiegel-erhöhenden Substanz *Forskolin* stimuliert: 24 h vor einer RNA-Isolation wurde Nephron-Kultur-Medium durch ein Medium aus 10% FCS, 50 mg/ml BPE und 10 µM *Forskolin* ersetzt. Es wurde kein Aldosteron zugesetzt. Als Kontrollen dienten E17 Kulturen, die in Nephron-Kulturmedium ohne *Forskolin* kultiviert wurden.

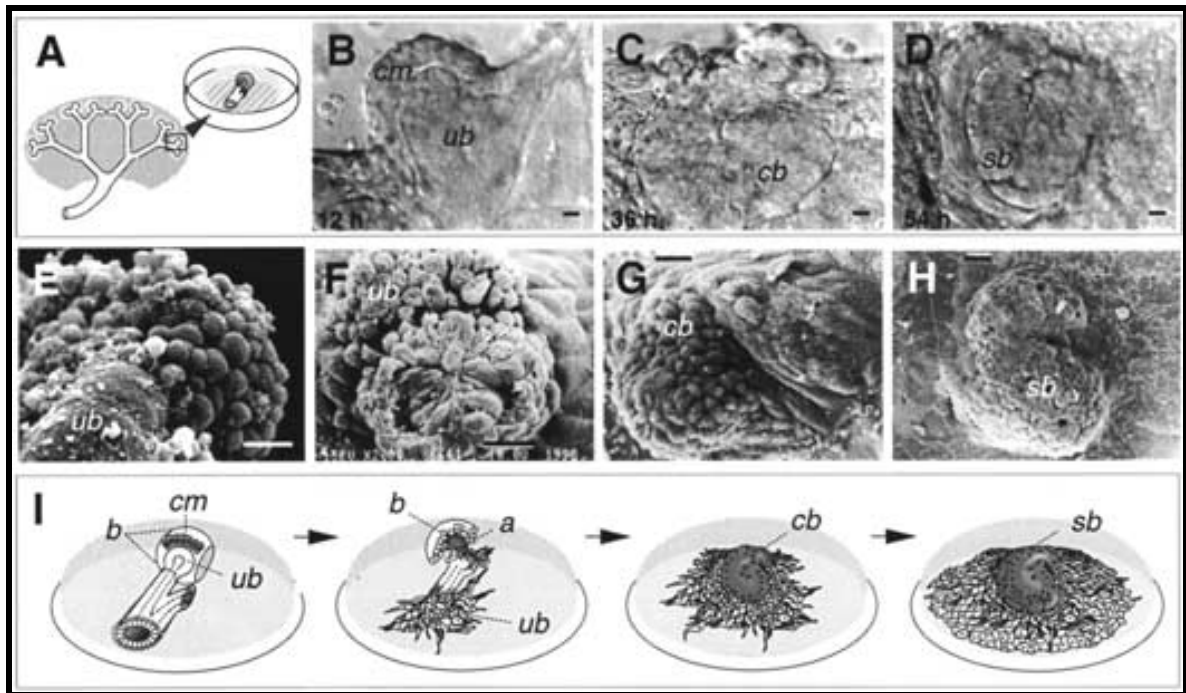
Die Effektivität der verwendeten Forskolin-Konzentration (10 mM) war in der Literatur gezeigt worden: 10  $\mu$ M Forskolin führen zu einer maximalen Heraufregulation der cAMP-abhängigen mRNA- und Protein-Expression von CFTR (Breuer et al. 1992).

### 2.2.1.3 *In vitro* Nephrogenese-Modell, Proliferationsassay

Ein Nephrogenese-*in-vitro*-Modell der Maus (Huber et al. 2000) wurde verwendet, um den Effekt des spezifischen  $K_{ATP}$ -Kanalöffners *Pinacidil* (Ashcroft und Gribble 2000) auf das Wachstum von Nephron- und Sammelrohrepithel-Zellen zu untersuchen. In diesem Modell bilden auf Kulturschalen explantierte Ureterknospen und adhärentes Mesenchym binnen 3er Tage Ureterknospen-Epithel-Monolayer, denen Nephronanlagen aufliegen, die sich bis zum S-shaped Stadium entwickeln (Huber et al. 2000) (**Abb. 2.5**).

In der hier vorgelegten Arbeit wurden Maus Ureterknospen-Strukturen disseziert und ohne Abtrennung des adhärenen Mesenchyms in Kulturschalen auf eine Rattenschwanz-Kollagen-Matrix explantiert, über Nacht in Nephron-Kultur-Medium gehalten und am Folgetag mit 40-facher Vergrößerung fotografiert. Dieses Initial-Stadium wurde als '0-Stunden' definiert. Danach wurden die Kulturen mit Medium behandelt, das Pinacidil (100  $\mu$ M) enthielt. Zur Wirkung von Pinacidil siehe Diskussion Kap. 4.2.2. Eine gleiche Anzahl an Kontroll-Kulturen wurde mit normalem Kulturmedium *ohne* Pinacidil weitergeführt. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Kulturen jeweils wieder mit gleicher Mikroskop-Einstellung an denselben Stellen fotografiert. Die Größe jeder Kultur zum Zeitpunkt 0-, 24- und 48-Stunden wurde in arbiträren Einheiten quantifiziert (Felder eines aus 35 Planquadraten bestehen Gitternetzes, das unter die Diapositive der fotografierten Kulturen gelegt wurde. Das Wachstum jeder Kultur zwischen 0 und 24 h und zwischen 0 und 48 h wurde in % der initialen Größe ('0-Stunden') angegeben. Die Behandlungsgruppen (Pinacidil- und Kontrollgruppe) wurden statistisch ausgewertet (Mittelwerte  $\pm$

Standardfehler/SE). Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden mit mittels Welch-Annäherung (Welch 1959) oder eines 2-seitigen unpaarigen t-Tests ermittelt (InStat-Software).



**Abb. 2.5 – Das *in-vitro*-Nephrogenese-Modell.** **A:** Skizze der Gewebepräparation. Ureterknospen mit adhärenem nephrogenem Blastem wurden aus Mausnieren (E14) disseziert, auf eine Mausekollagenmatrix explantiert und für 3-4 Tage in Kultur gehalten. **B-D:** Lichtmikroskopische Aufnahmen der Nephron-Entwicklung *in vitro*. Das der Ureterknospe (ub) aufliegende nephrogene Blastem durchläuft die Stadien des kondensierten Mesenchyms (cm), des kommaförmigen Körpers (cb) bis hin zum S-förmigen Körper (sb). **E-H:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der in A-D gezeigten Strukturen. **I:** Schema der ablaufenden Entwicklungsschritte *in vitro*. **Ganz links** eine explantierte Ureterknospe (ub) mit aufliegendem mesenchymalem Blastem (b) von welchem ein Teil zur Nephrogenese induziert wird und kondensiertes Mesenchym bildet (cm). Vom Ureterbaum ausgehende Ureterknospen-Epithelien (ub) proliferieren und bilden schließlich einen Monolayer (**ganz rechts**). Dem Ureterepithel aufliegend bilden sich aus dem kondensierten Mesenchym die Nephron-Stadien *Aggregat* (a), *kommaförmiger Körper* (cb) und *S-förmiger Körper* (sb). Balken = 10 µm. Abbildung aus: Huber et al. 2000.

### 2.2.1.4 HEK293-Zellkultur, Proliferationsassay

HEK293-Zellen (200.000 Zellen pro Kulturschale) wurden für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf 3,5 cm-Kulturschalen in DMEM-Medium + 10% FCS kultiviert. Anschließend wurde eine Zellpopulation mit PBS gewaschen und mittels **Fluoreszenz-Aktiviertem-Cell-Sorting** (FACS) quantifiziert und dann statistisch ausgewertet, um die "Ausgangszellzahl" zu definieren. Die andere Zellpopulation wurde für weitere 24 h in serumfreiem Medium kultiviert, wobei nichts (Kontrollen), Pinacidil (1, 10, 100 µM) oder Pinacidil (10 µM) plus Glibenclamid (3 µM) zugegeben wurde. Im Anschluß wurde die Zellzahl per FACS quantifiziert und statistisch ausgewertet. Daten sind in Mittelwerten ± Standardfehler (SE). Die statistische Signifikanz zwischen unterschiedlichen Behandlungsgruppen wurde per t-Test ermittelt (InStat-Software).

## 2.2.2 Nukleinsäure-Techniken

### 2.2.2.1 RNA-Präparation und Reverse Transkription

Gesamt-RNA (1-2 µg) aus 6-18 konfluenten Monolayer-Kulturen oder aus HEK293-Zellkulturen wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) mit Tri-Reagenz<sup>®</sup> doppel-extrahiert und anschließend revers-transkribiert. Der Reaktions-Ansatz bestand aus zwei Komponenten:

**A:** 9 µl H<sub>2</sub>O  
1 µl DTT  
0.5 µl RNAsin  
0.5µl (1 µg /µl) oligo (dT)<sub>12-18</sub>

**B:** 4 µl H<sub>2</sub>O  
0.4 µl dNTP-mix (je 25 mM)  
0.5 µl Reverse Transkriptase: SuperScript II<sup>®</sup>  
4 µl Puffer

Die getrocknete RNA wurde in **Ansatz A** für 5 min bei 65° C gelöst und nach Zugabe von **Ansatz B** für 50 min bei 42° C revers-transkribiert. Produkt dieser Reaktion sind DNA Moleküle, die zur Sequenz der eingesetzten mRNA-Moleküle komplementär sind (cDNA). Im Anschluss hieran wurde die erhaltene cDNA gereinigt (siehe Kap. 2.2.2.2) und in 20-40 µl H<sub>2</sub>O wieder aufgelöst, um mittels PCR analysiert zu werden (siehe Kap. 2.2.2.3).

Zur Präparation von PCR-Positiv-Kontrollen wurden adulte Rattennieren in flüssigem Stickstoff schockgefroren, Stücke von 1/20 bis 1/5 der Nieren-Größe mit Hilfe eines Mikrorührstabes und eines Ultraschall-Zerkleinerers in Tri-Reagenz<sup>®</sup> gelöst und wie oben beschrieben weiterprozessiert.

## 2.2.2.2 DNA-Extraktion

Zu wässriger DNA oder cDNA-Lösung wurde ein gleiches Volumen an Phenol/Chloroform-Lösung (pH 7.5, Sigma) gegeben, die Phasen vermischt und in einer Tischzentrifuge wieder getrennt. Die DNA-haltige obere wässrige Phase wurde abgenommen und 1/10 des Volumens an Natriumacetat (3 mol/l, pH 5.3) und das 2,5-fache des Volumens an Ethanol 100 % zugegeben. Nach Fällung der DNA (-20° C; 1 h) wurde die Probe zentrifugiert (12.000 g; 4° C, 15 min), das Präzipitat mit Ethanol 70 % gewaschen, getrocknet und in H<sub>2</sub>O (20-40 µl) aufgenommen.

## 2.2.2.3 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

1 µl cDNA-Lösung wurde in einem 25 µl PCR-Ansatz in einem Thermocycler amplifiziert. PCR-Ansatz und Reaktions-Protokoll waren folgendermaßen aufgebaut:

**PCR-Ansatz:** dNTPs (jeweils 50  $\mu$ M)  
Primer (je 100 nM; 200 nM für ROMK1, ROMK3, V2R;  
300 nM für Kir6.1-II und SUR2-II)  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
PCR-Reaktionspuffer  
0.625 U Taq-Polymerase<sup>®</sup>

**Reaktions-Protokoll:** 3 min initiale Denaturierung bei 94°C  
30 x (35 x für CFTR, V2R, Kir6.1-II und SUR2-II):  
[ 45 sec Denaturierung bei 94°C;  
1 min Annealing bei x°C (siehe Kapitel 2.1.3);  
1 min Extension bei 72°C ] ;  
7 min finale Extension bei 72°C

Die verwendeten Primer einschließlich Annealing Temperatur sind in Kapitel 2.1.3 beschrieben. Für die RT-PCR aus HEK293-Zellen wurden die Primer Kir6.1-II und SUR2-II eingesetzt. Diese waren höher konzentriert als die Kir6.1- und SUR2-Primer für die Analyse von Sammelrohrethel-Monolayer-Primärkulturen, für die Analyse von HEK293-Zellen wurden 35 anstatt 30 Zyklen gefahren. PCR-Proben, in die RNA oder Wasser als Matrize eingesetzt wurde, wurden mit jedem PCR-Durchgang als sogenannte 'RT-minus' und 'H<sub>2</sub>O-Kontrolle' mitgeführt und waren stets negativ. Bei jedem PCR-Durchgang wurde auch eine Probe adulter Nieren-cDNA als Positiv-Kontrolle mitgeführt.

## 2.2.2.4 Gel-Elektrophorese

### Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Die RT-PCR-Produkte aus Sammelrohrethel-Monolayer-Primärkulturen wurden auf ein nicht-denaturierendes 5%-iges Polyacrylamid-Gel (siehe Kap. 2.1.2) aufgetragen. 12  $\mu$ l jeder PCR-Reaktion sowie ein molekularer Größenmarker (pUC-

Mix<sup>®</sup>) wurden bei 120 V Spannung in einer horizontalen Gelkammer (Biorad) aufgetrennt, mit Vistragreen<sup>®</sup> gefärbt, in einem Storm 840 Fluorophosphor Imager eingescannt und als Computerausdruck visualisiert. Die Fluoreszenz-Intensität der gescannten spezifischen Banden wurde mittels ImageQuant-Software<sup>®</sup> in einem Apple Power-Macintosh quantifiziert und in absoluten Werten in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel übertragen.

## Agarose-Gel-Elektrophorese

Die RT-PCR-Produkte aus HEK293-Zellen wurden auf ein 2%-iges Agarose-Gel aufgetragen (25 µl) und bei 60 V Spannung in einer vertikalen Gelkammer (Biozym) aufgetrennt. Die Färbung und Visualisierung der spezifischen Banden erfolgte mit Ethidiumbromid und einer UV-Lichtquelle.

Die erhaltenen DNA-Banden auf einem Gel entsprachen spezifischen PCR-Produkten, deren Länge anhand des molekularen Größenmarkers bestimmt wurde. Das Auftreten eines PCR-Produkts in der vorausberechneten Länge weist stark auf seine Spezifität hin (Mullis 1990). Zusätzlich wurde die Spezifität jedes verwendeten Primer-Paares mindestens einmal mittels Sequenzierung (siehe unten) demonstriert.

### 2.2.2.5 Sequenzierung von PCR-Produkten

Um die Spezifität aller verwendeten Primer-Paare zu zeigen, wurden PCR-Produkte nach der Methode der *direkten Sequenzierung* sequenziert (Phear et al. 1994). Diese stellt eine Kombination der Methode von Sanger (Sanger et al. 1977) mit einem PCR-Verfahren dar. Hierzu wurde ein PCR-Ansatz nach Ablauf der PCR-Reaktion über eine DNA-Purifikations-Säule (Quiagen) aufgereinigt und die DNA (> 100 ng) an ein kommerzielles Sequenzierungsinstitut weitergegeben. Dort wurde eine enzymatische DNA-Replikation durch fluoreszierende 2'-3' di-desoxy-DNA-

Analoga der jeweiligen Nukleotide kontrolliert unterbrochen, die erhaltenen Produkte auf einem Gel aufgetrennt und durch einen Leseautomaten ausgewertet.

Die durch *alternatives Splicing* hervorgerufenen Doppelbanden bei CFTR- und CLC-2-PCR-Reaktionen wurden zur Sequenzierung wie folgt präpariert: PCR-Proben wurden in *low-melting* Agarose-Gelen nach Angaben des Herstellers aufgetrennt, mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert, die Banden einzeln mit einer Rasierklinge ausgeschnitten, die DNA aus der Agarose nach Angaben des Herstellers eluiert, in einer DNA-Purifikations-Säule (Quiagen) aufgereinigt und sequenziert.

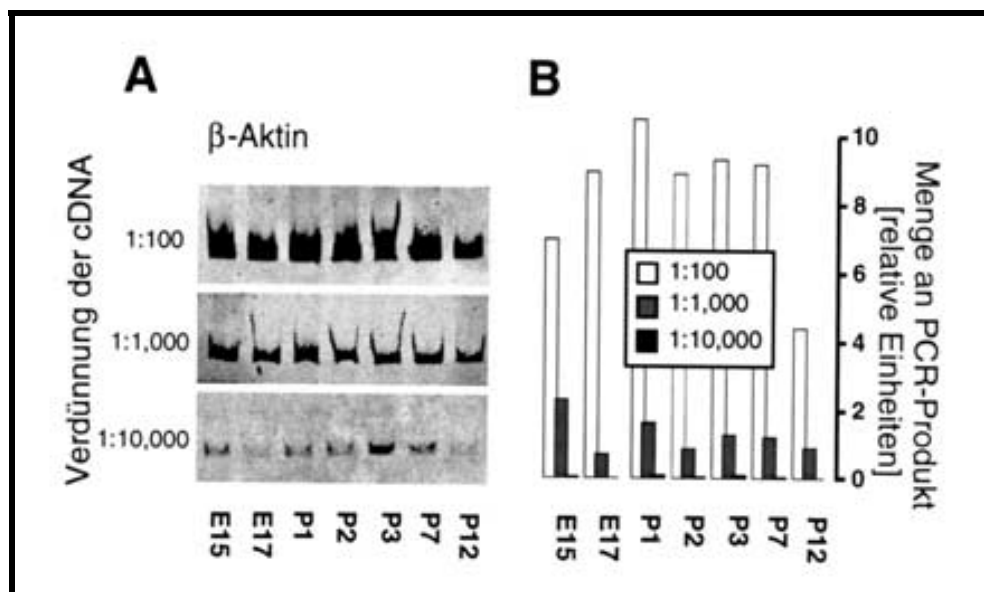
### 2.2.2.6 Quantifizierung von PCR-Produkten

Es wurden mehrere Serien von cDNA-Präparationen mit anschließender PCR-Analyse durchgeführt. Jede Serie enthielt 5-10 Proben aus verschiedenen embryonalen und postnatalen Stadien (bzw. jeweils 2-4 Proben aus Forskolin-stimulierten E17 Kulturen und deren Kontrollen), deren cDNA Konzentration mit Hilfe des  $\beta$ -Aktin PCR-Produkts einander angeglichen wurden (**schematisch zusammengefasst in Abb. 2.1**). Der maximale erlaubte Konzentrationsunterschied zwischen Proben einer Serie betrug Faktor 1.5. Die  $\beta$ -Aktin-spezifischen PCR-Reaktionen wurden mit 1/1.000 oder 1/10.000-fach verdünnter cDNA durchgeführt, so dass sie eine lineare, nicht-sättigende Kinetik zeigten (**Abb. 2.6**).

Dann wurden ebenfalls nicht-sättigende Ionenkanal- und Vasopressin-Rezeptor-spezifische PCR-Reaktionen mit den Proben einer angeglichenen Serie durchgeführt (cDNA-Verdünnungen von 1:1 bis 1:50). Die Produktmengen wurden quantifiziert, sowie durch den Wert des zugehörigen  $\beta$ -Aktin-PCR-Produkts und durch den Wert des höchsten Ionenkanal- und Rezeptor-spezifischen PCR-Produkts einer Serie dividiert (z.B. E14-17 für Kir6.1 und SUR2; P21-28 für ROMK2). Bei *Forskolin*-Stimulations-Experimenten und deren Kontrollen wurde durch den höchsten 'Forskolin'-Wert dividiert.



Die so erhaltenen relativen Werte der Ionenkanal-mRNA-Expression ermöglichten den Vergleich der einzelnen cDNA Präparations-Serien miteinander und die statistische Auswertung. Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SE) angegeben und die Signifikanz ihrer Unterschiede mit Hilfe eines Statistik-Computerprogramms (InStat und Origin) analysiert: Für Kir6.1, ROMK2, SUR2: (i) ANOVA und (ii) zweiseitiger unpaariger t-Test oder Welch-Annäherung (Welch 1959). Für  $\alpha$ -ENaC zweiseitiger Mann-Whitney-Test.



**Abb. 2.6 –  $\beta$ -Aktin-Normalisierung der cDNA.** **A:** Die cDNA-Konzentration der verschiedenen Proben einer Serie wurde solange durch Verdünnung aneinander angepasst, bis die Amplifikation eines  $\beta$ -Aktin-Fragments in den sequentiellen Verdünnungen aller Proben einer Versuchsserie vergleichbare PCR-Produkt-Mengen ergab. **B:** Es wurden die Verdünnungs-Stufen 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:20.000, und 1:50.000 hergestellt (gezeigt sind 1:100, 1:1.000 und 1:10.000). Bei den Verdünnungen 1:1.000 und 1:10.000 war die PCR-Produktmenge direkt proportional zur cDNA-Verdünnungs-Stufe.

## 2.2.3 Protein-Techniken

Für Immunhistochemische Untersuchungen an prä-, peri- und postnatalen Rattenhirnen wurden polyklonale Antikörper gegen K<sup>+</sup>-Kanal Untereinheiten verwendet.

### 2.2.3.1 Polyklonaler Kir6.1-Antikörper

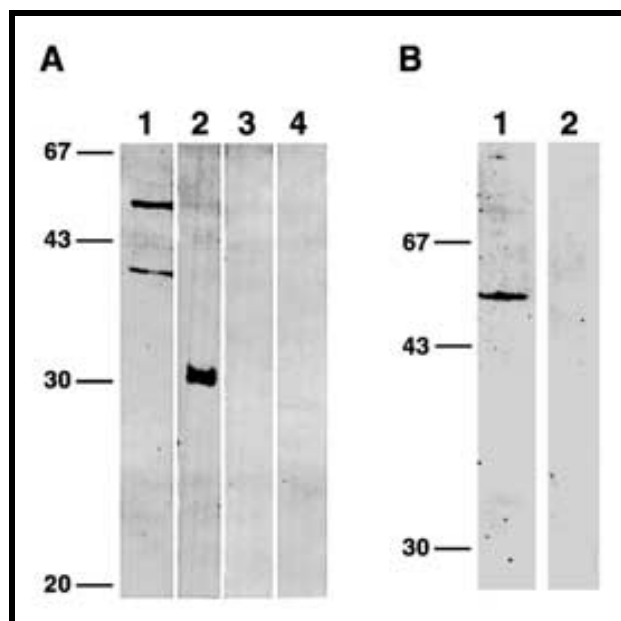
Ein polyklonaler Kir6.1-Antikörper wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Veh, Anatomisches Institut der Charité, Berlin wie folgt hergestellt und charakterisiert (Thomzig et al. 2001, Skatchkov et al. 2001):

C-terminale Fragmente von Kir-Kanälen wurden in bakterielle Expressions-Vektoren kloniert, in *E. coli* exprimiert und Fusionsproteine isoliert (nach Smith und Johnson 1988, Stüber et al. 1990): (1) Kir6.1 (Aminosäuren/AA 361-424)-Glutathion-S-Transferase (GST); (2) Kir6.1 (AA 361-424)-pScreen 1b; (3) Kir6.2 (AA 343-390)-GST; (4) Kir6.2 (AA 337-390)-Dihydrofolat-Reduktase (DHFR); (5) Kir3.2 (AA 365-425)-DHFR. Ein Kaninchen (New Zealand white rabbit; Alter 5 Monate) wurde mit Kir6.1-GST immunisiert, und das gewonnene Serum mittels Kir6.1-pScreen beschichtetem ELISA auf seine Spezifität getestet (nach Harlow und Lane 1988). Screening des Serums auf Kreuzreaktivitäten (KR) mittels Kir6.2-DHFR und Kir3.2-DHFR beschichtetem ELISA ergab keine KR gegen Kir3.2. Eine schwache KR gegen Kir6.2 wurde durch schrittweise Adsorption an Kir6.2-Antigen-beschichtete Nitrozellulosestreifen entfernt (nach Pitt et al. 1998). In einem letzten Schritt wurde das Antiserum affinitätsgereinigt, wobei auf Nitrozellulose fixiertes Kir6.1-pScreen Fusionsprotein als Antigen diente. Antiserum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20° C aufbewahrt.

Rattenhirn gesamt-Homogenat und Kir6.1- und Kir6.2-Fusionsproteine wurden in SDS-Puffer aufgelöst, erhitzt (5 min, 90° C) und mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE; 10% für Rattenhirn Gesamt-Homogenat; 12% für Fusionsproteine) aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membranen geblottet. Die Membranen wurden 1 h lang in Western-Blot-blocking-Puffer inkubiert und über

Nacht bei 4° C mit Kir6.1-Antikörper inkubiert (Verdünnung 1:300 für Hirn-Homogenat und 1: 50.000 für Kir6.x-Fusionsproteine in 10 % Magermilch in PBS mit 0.5% Tween-20). Es folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 4 h mit an Alkalische Phosphatase konjugiertem Ziegen Anti-Kaninchen IgG, 1:1000 verdünnt in TTBS. Nach einem Waschschrift in TTBS wurde zur Detektion (NBT/BCIP)-Substrat verwendet.

Wie in **Abb. 2.7** gezeigt, detektierte der Kir6.1-Antikörper Fusionsproteine von Kir6.1, jedoch nicht von Kir6.2. Der Western-Blot des Hirn-Homogenats zeigte eine Bande bei 50 kD, dem Molekulargewicht von Kir6.1-Protein (Inagaki et al. 1995a). Präadsorption des Antikörpers mit Kir6.1-Antigen ergab keine Banden. Diese Daten belegen die Spezifität des in der Immunhistologie eingesetzten Kir6.1 Antikörpers.



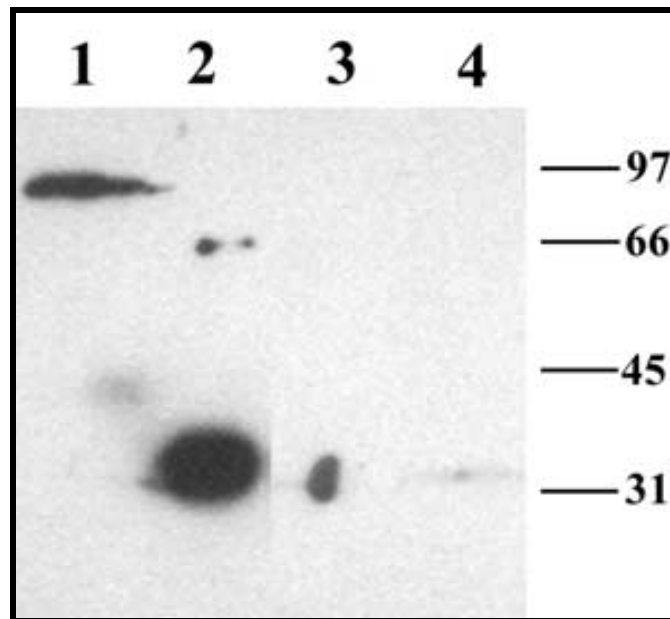
**Abb. 2.7 – Western-Blot-Charakterisierung des Kir6.1-Antikörpers** (Abb.: Prof. Veh, Berlin). **A:** Die Fusionsproteine Kir6.1-pScreen (Bahn 1), Kir6.1-GST (Bahn 2), Kir6.2-DHFR (Bahn 3) und Kir6.2-GST (Bahn 4) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Kir6.1-Antikörper geblotted. Der Antikörper erkennt Kir6.1- jedoch nicht Kir6.2-Antigen. **B:** Gesamt-Rattenhirn-Homogenat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Kir6.1-Antikörper (links) und mit Antigen-präadsorbiertem Antikörper geblotted (rechts; keine Bande). Der Antikörper detektierte eine Bande bei 50 kD, dem Molekulargewicht von Kir6.1-Protein.

### 2.2.3.2 Polyklonaler ROMK-Antikörper

Es wurde ein kommerziell erhältlicher polyklonaler ROMK-Antikörper verwendet (APC-001 - Alomone Labs, Jeruaslem, Israel; u.a. charakterisiert in Mennitt et al. 2000). Dieser ist gegen die ROMK-Isoformen 1-3 (Kir1.1a-c) gerichtet. Die Herstellung erfolgte durch Immunisierung von Kaninchen mit einem Fusionsprotein aus den ROMK-Aminosäuren (AA) 342-391 und aus dem *Schistosoma japonicum* Glutathion-S-Transferase-Protein (GST).

Wie in **Abb 2.8** gezeigt, erkennt der Antikörper spezifisch ROMK(AA 342-391)-GST-Fusionsprotein sowie eine zweite Bande exakt doppelter Größe, die vermutlich einem Dimer entspricht (Mennitt et al. 2000). Die erwartete Größe des nativen ROMK-Proteins liegt bei ~45 kD (Ho et al. 1993). Die Western-Blot-Analyse von nativen Proteinen aus Ratten-Nieren-Membranfraktionen zeigt eine schwache Bande bei ~45 kD sowie eine deutliche Bande bei ~80 kD (**Abb. 2.8**). In einer weiteren Studie detektierte der Antikörper eine singuläre Bande bei ~45 kD (Mennitt et al. 2000). Präinkubation des Antikörpers mit dem immunisierenden ROMK(AA 342-391)-GST-Fusionsprotein (200 µg; für 2 h) verhinderte die Detektion von spezifischen Banden (**Abb. 2.8**). Dies lässt darauf schließen, dass die in der nativen Protein-Präparation detektierten Banden mit dem ROMK-Peptid um Antikörperbindung konkurrieren, was für die ROMK-Spezifität des Antikörpers spricht.

Die Herkunft der 80 kD-Bande in den hier gezeigten Untersuchungen (**Abb. 2.8**) ist wahrscheinlich auf Dimerisierung des ROMK-Proteins aus nativen Präparationen zurückzuführen: 3 weiteren Studien mit Antikörpern gegen andere C-terminale ROMK-Epitope (AA 252-391, AA 369-391, AA 360-391) zeigen bei nativen Protein-Präparationen neben einer ~42-45 kD-Bande zusätzlich Banden bei ~80-90 kD, ~60-75 kD bzw. 77 kD (Xu et al. 1997, Mennitt et al. 1997/Mennitt et al. 2000, Kohda et al. 1997). Immunhistologisch markieren alle Antikörper in diesen Studien Epithelien im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (TAL) und Sammelrohr-Hauptzellen, was der erwarteten Lokalisation von ROMK-Protein entspricht (Boim et al. 1995).



**Abb. 2.8 – Western-Blot-Charakterisierung des ROMK-Antikörpers (Abbildung: Dr. G. Idelson, Alomone Labs, Jerusalem, Israel).** Spur 1: Ratten-Nieren Membranproteinfraktion inkubiert mit ROMK-Antikörper, Banden bei ~80 kD (deutlich) und ~45 kD (schwach). Spur 2: ROMK(AA 342-391)-GST-Fusionsprotein inkubiert mit ROMK-Antikörper, Banden bei 33 kD (erwartete Größe des Fusionsproteins) und 66 kD. Spur 3: Ratten-Nieren-Membranproteinfraktion inkubiert mit ROMK(AA 342-391)-Antigenpräadsorbiertem-Antikörper, keine Detektion von Banden außer Artefakt durch Verunreinigung mit ROMK(AA 342-391)-GST-Fusionsprotein bei 33 kD. Spur 4: ROMK(AA 342-391)-GST-Fusionsprotein inkubiert mit Antigenpräadsorbiertem-ROMK-Antikörper, keine 66kD-Bande und deutliche Reduktion der 33 kD-Bande.

### 2.2.3.3 Histologische Präparation von Nieren

Embryonale, perinatale und adulte Nieren von *Wistar*-Ratten wurden in 1:1 in H<sub>2</sub>O verdünnter Karnovsky-Lösung fixiert: E15 und E17 für 15 min; P1, P5 und P7 für 30 min; adult für 120 min. Es folgte die Einbettung in Paraffin durch einen Automaten für humane Routine-Histologie. Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Klingens-Mikrotoms 2 µm dünn geschnitten, auf silikonbeschichtete Objektträger übertragen und über Nacht bei 60°C getrocknet.

## 2.2.2.4 Immunhistochemie

Die Entparaffinierung der Gewebeschnitte erfolgte in Rotihistol® für 10 min und in einer anschließenden absteigenden Alkoholreihe für je 3 min. Endogene Gewebs-Peroxidase wurde blockiert (2% Lösung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol; 15 min), die Schnitte wurden in TBS gewaschen, für 10 min bei 1 bar autoklaviert (Citratlösung, 10 mM, pH 6.5) und in TBS gewaschen (15 min). Potentiell unspezifische Antigene für das Antikörper-Detektionssystem wurden für 10 min geblockt in 2% Ziegenserum in PBS. In Schnitten der Stadien P5/P7 und adult wurde zusätzlich endogenes Biotin mit Hilfe eines Biotin-Avidin-blocking-Kits blockiert, um falsch-positive Hintergrundfärbung durch unspezifische Bindung von Avidin-konjugierter Peroxidase zu vermeiden.

Nach kurzem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit Anti-Kir6.1- (1:100-200 in PBS, 1% Ziegenserum, 0.01% BSA) oder Anti-ROMK-Antikörper (1:60-100 in PBS, 2% Ziegenserum, 0.01% BSA) für 2 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Für Negativ-Kontrollen wurden die histologischen Gewebsschnitte mit Antikörper beschickt, der zuvor über Nacht mit dem immunisierenden Antigen co-inkubiert worden war: Kir6.1: 2 µg Kir6.1-Antigen / µl unverdünntes Kir6.1-Antiserum. ROMK: 8 µg ROMK-Antigen / µg ROMK-Antikörper).

Zur Detektion wurden ein biotinylierter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, Avidin-konjugierte Peroxidase und AEC-Chromogen entsprechend den Instruktionen des Herstellers verwendet (Biogenex Super Sensitive Kit®). Positive Färbung stellte sich rotbraun dar.

Zur Identifizierung von dicken aufsteigenden Schenkeln der Henle'schen Schleife (TAL) wurden ein Anti-Tamm-Horsfall-Protein-Antikörper (0.8 mg/ml) und ein biotinylierter Anti-Schaaf IgG Antikörper (0.7 µg/ml) wie oben beschrieben verwendet.

Alle Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (Leitz DM R) analysiert und mit Kunstlichtfilmen fotografiert.

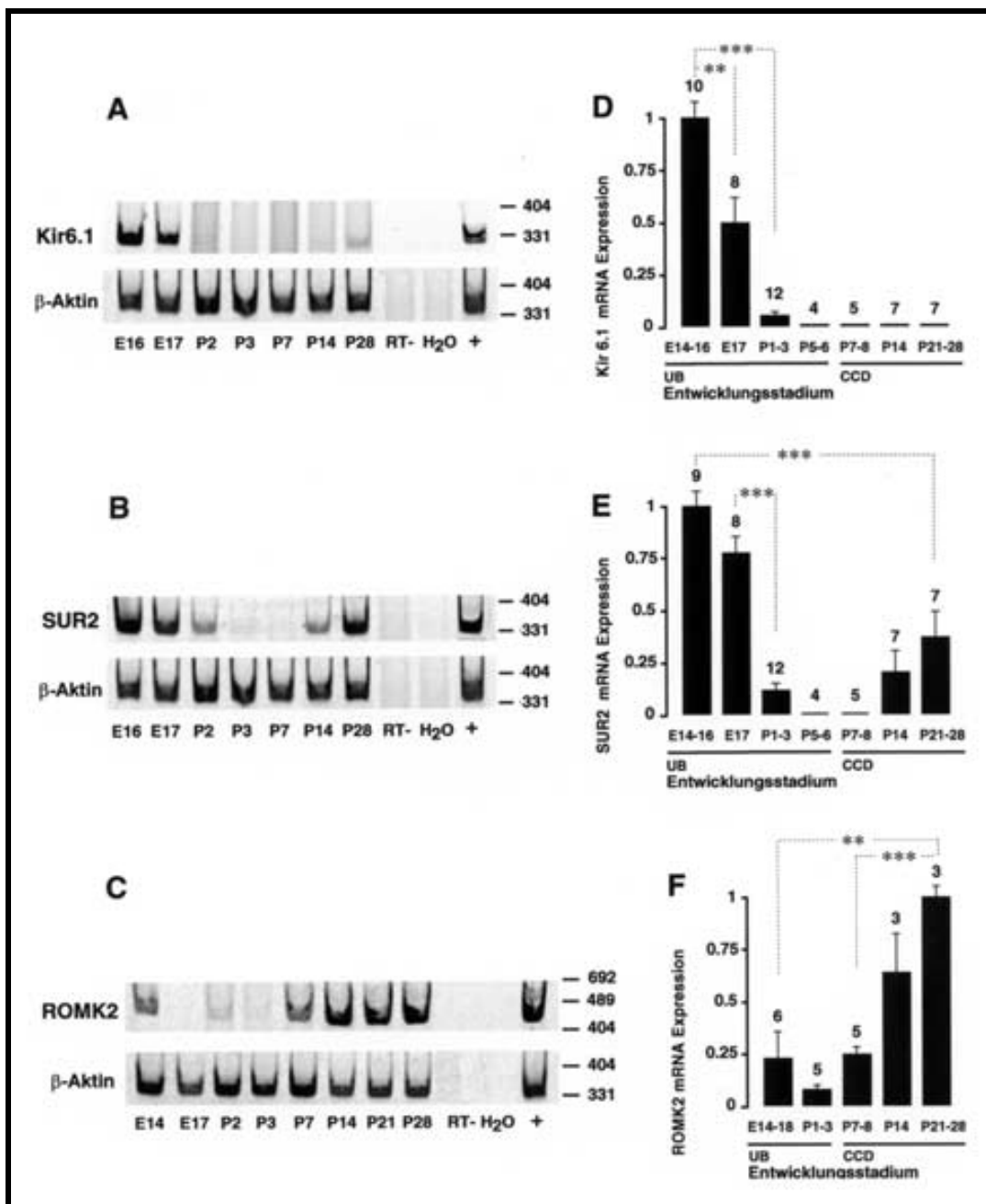
## Kapitel 3 Ergebnisse

### 3.1 K<sup>+</sup>-Kanäle im Sammelrohrepithel

K<sup>+</sup>-Kanäle sind ubiquitär und bestimmen durch ihre Leitfähigkeit maßgeblich das Ruhemembranpotential der meisten Zelltypen. In der adulten Niere sind Kir-Kanäle (eingeführt in Kap. 1.3.1) wie z.B. ROMK an wichtigen Transportfunktionen beteiligt (beschrieben in Kap. 1.4). Ferner sind K<sup>+</sup>-Leitfähigkeiten für die Proliferation und Apoptoseregulation vieler Zelltypen essentiell (diskutiert in Kap. 4.2.2). Änderungen der K<sup>+</sup>-Kanalexpression während der Organentwicklung sind daher zu erwarten. Folglich wurde hier erstmals die Expression der K<sup>+</sup>-Kanal-Untereinheiten Kir6.1-, SUR2- und ROMK1-3 während der Nephrogenese auf mRNA-Ebene, sowie die Expression von Kir6.1 und ROMK auf Protein-Ebene untersucht. – Zuvor war im Rahmen eines Screenings die renale mRNA-Expression von Kir-Untereinheiten festgestellt worden, wobei neben obengenannten Kanälen auch Kir3.1 und Kir3.4 detektiert, jedoch nicht weiter untersucht wurden. Kir2.1, Kir2.2, Kir6.2 und SUR1 konnten nicht nachgewiesen werden.

#### 3.1.1 Kir6.1-, SUR2- und ROMK-mRNA-Expressionsmuster

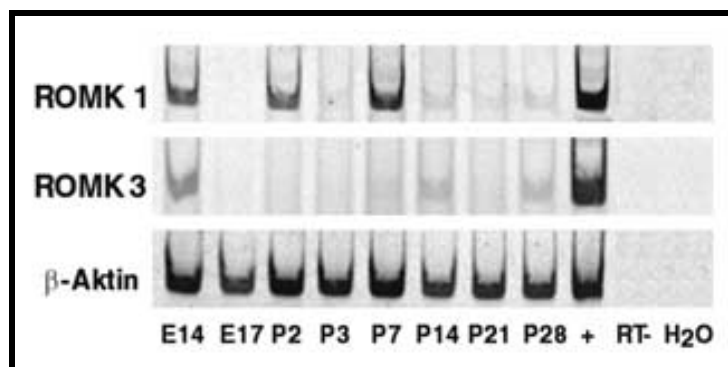
Kir6.1- und SUR2-mRNA wurden während der Stadien E14 bis E17 gleichzeitig hoch exprimiert, postnatal jedoch stark herunterreguliert ( $p < 0.002$ ) (**Abb. 3.1 A,D und B,E**). Die Expression von SUR2 - jedoch nicht von Kir6.1 - nahm nach Vollendung der Sammelrohr-Morphogenese (während P14 bis P28) erneut zu.



**Abb. 3.1 – RT-PCR. Entwicklungsabhängige K<sup>+</sup>-Kanal-mRNA-Expression in Sammelrohrepithel-Monolayer-Primärkulturen.** A-C: Obere Gele: Kir6.1-, SUR2- und ROMK2-spezifische PCR-Produkte. Untere Gele: entsprechende Produkte des Housekeepers β-Aktin. Repräsentative Experimente sind gezeigt. (RT-) und (H<sub>2</sub>O): Negativ-Kontrollen mit RNA bzw. Wasser als Matrize. (+): Positiv-Kontrolle. Produktlängen: Kir6.1: 330 Bp, SUR2: 345 Bp, ROMK2: 447 Bp und β-Aktin: 351 Bp. Rechter Gel-Rand: molekularer Größenmarker in Bp. D-F: Quantifizierung der PCR-Ergebnisse. β-Aktin-normalisierte Expressions-Werte sind in arbiträren Einheiten gegen das Entwicklungsstadium aufgetragen. Gezeigt sind Mittelwerte ± SE, (n = siehe oberhalb Säulen), \*\*  $P \leq 0.02$ , \*\*\*  $P \leq 0.002$ , zweiseitiger unpaariger t-Test oder Welch-Annäherung (Welch 1959) sowie ANOVA.



Im Gegensatz dazu stieg die mRNA-Expression von ROMK2 mit der Entwicklung an. ROMK2-mRNA konnte bereits bei E14 detektiert werden und wurde von P7-8 nach P21-28 um den Faktor 4.2 ( $p < 0.002$ ) heraufreguliert (**Abb. 3.1 C,F**), im gleichen Zeitfenster, in dem auch SUR2-mRNA wieder heraufreguliert wurde (**Abb. 3.1 B,E**).

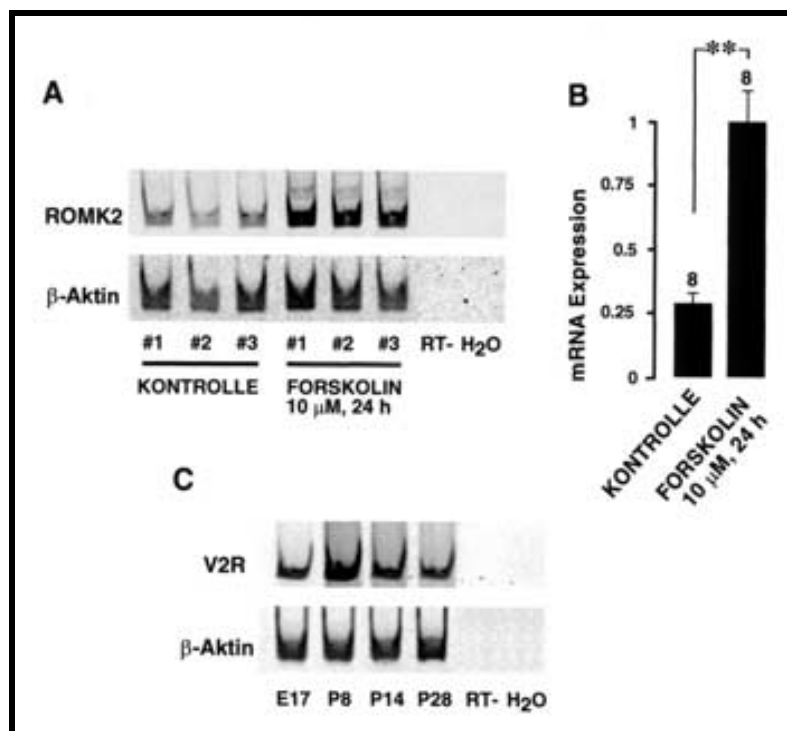


**Abb. 3.2 – RT-PCR. Entwicklungsabhängige ROMK1- und ROMK3-mRNA Expression in Sammelrohrepithel-Monolayer-Primärkulturen.** Obere Gele: ROMK1- und ROMK3-spezifische PCR-Produkte. Untere Gele: entsprechende PCR-Produkte des Housekeepers  $\beta$ -Aktin. Repräsentative Experimente sind gezeigt. (+): PCR-Ansatz mit cDNA adulter Ratten-Nieren als Positiv-Kontrolle. (RT-) und (H<sub>2</sub>O): Negativ-Kontrollen mit RNA bzw. Wasser als Matrize. Produktlängen: ROMK1: 574 Bp, ROMK3: 269 Bp und  $\beta$ -Aktin: 351 Bp. Maximale ROMK1-Expression bei ~P7, Maximale ROMK3-Expression gegen P14-28, (n = 3-4 pro Stadium).

ROMK ist der apikale K<sup>+</sup>-Kanal der adulten distalen Nephronabschnitte und des adulten Sammelrohrs (Giebisch 1998). ROMK2 ist die in der adulten Niere am weitesten verbreitete Isoform (dicker aufsteigender Schenkel der Henle'schen Schleife/TAL bis Sammelrohr), während ROMK1 und ROMK3 nur im Kortikalen Sammelrohr bzw. im TAL und Verbindungs-Segment (DCT) exprimiert werden (Boim et al. 1995). Die Expression von ROMK1- und ROMK3-mRNA wurde hier auch untersucht, wobei sporadisch PCR-Produkte in allen Stadien detektiert werden konnten (**Abb. 3.2**). Die höchste mRNA-Expression von ROMK1 lag bei ~P7, die ROMK3-mRNA Expression nahm gegen P14-28 zu (n = 3-4 für jedes Stadium). Diese Daten waren für eine statistische Auswertung nicht ausreichend.

### 3.1.2 Einfluß von cAMP auf die ROMK-mRNA-Expression

Um einen möglichen Mechanismus der Regulation der ROMK2-mRNA-Expression während der Reifung des Kortikalen Sammelrohrs (CCD) zu identifizieren, wurde in E17-Monolayer-Primärkulturen das Enzym Adenylatzyklase (AC) direkt mittels *Forskolin* (10  $\mu$ M; 24 h) stimuliert.



**Fig. 3.3 – RT-PCR. *Forskolin*-induzierte Hochregulation von ROMK2-mRNA in E17 UB-Epithel-Monolayer-Primärkulturen.** **A:** Oberes Gel: ROMK2-PCR-Produkte aus UB-E17-Kulturen, die für 24 h vor der RNA-Isolation mit *Forskolin* (10  $\mu$ M) stimuliert wurden, sowie Kontroll-Kulturen. Repräsentative Experimente aus jeweils 3 Zellkulturen sind gezeigt. Unteres Gel: korrespondierender Housekeeper  $\beta$ -Aktin. **B:** Quantifizierung der  $\beta$ -Aktin-normalisierten ROMK2-Produktmengen. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE in arbiträren Einheiten. *Forskolin* führte zu einer Heraufregulierung von ROMK2-PCR-Produkt um den Faktor 3.5 gegenüber den Kontrollen, (n = 8),  $**P \leq 0.01$ , 2-seitige unpaarige Welch-Annäherung (Welch 1959). **C:** Oberes Gel: Detektion von mRNA für den Vasopressin-Rezeptor-Typ-2 (V2R) in Ureter- und Sammel-rohrepithel-Monolayer-Primärkulturen. Unteres Gel: korrespondierendes  $\beta$ -Aktin-Produkt. (RT-): PCR-Ansatz mit RNA als Negativ-Kontrolle; (H<sub>2</sub>O): PCR-Ansatz mit Wasser Anstelle von cDNA als Negativ-Kontrolle. Produktlängen: ROMK2: 447 Bp,  $\beta$ -Aktin: 351 Bp und V2R: 238 Bp.

*In vivo* erfolgt die Stimulation der AC z.B. über membranständige Rezeptoren wie den Vasopressin-Rezeptor-Typ2 (V2R). AC aktiviert im Anschluss über zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) Kinasen, die unter anderem die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren erhöhen (Referenzen siehe Diskussion Kap. 4.4.3). Die Stimulation von E17 Monolayer-Primärkulturen mit Forskolin (10  $\mu$ M) während der letzten 24 h vor der mRNA-Isolation führte gegenüber Kontrollkulturen zu einem signifikanten Anstieg des erhaltenen ROMK2-PCR-Produkts um den Faktor 3.5 ( $p < 0.01$ ) (**Abb. 3.3 A,B**). In Stichproben gleichzeitig durchgeführte Messungen der CFTR-mRNA-Expression mittels RT-PCR zeigten wie erwartet einen Expressionsanstieg auf Forskolin (die CFTR-mRNA-Expression ist cAMP-abhängig; Breuer et al. 1992) und bestätigten so die Effektivität der verwendeten Forskolin-Dosen (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten zeigen, dass cAMP-abhängige Signalwege die Expression von ROMK2-mRNA steigern können. *In vivo* könnte eine solche Heraufregulation der ROMK-Expression über V2R vermittelt sein, da in unseren Experimenten V2R mRNA in E17, P8, P14 und P28 Monolayer-Primärkulturen exprimiert wurde (**Abb. 3.3 C**). **Diskussion siehe Kap. 4.4.3.**

### 3.1.3 Kir6.1- und ROMK-Immunhistochemie im Sammelrohr

Daten über die räumliche Expression von Ionenkanälen (zytosolisch, mitochondrial, plasmamembranständig) sind entscheidend für die Interpretation der quantitativen mRNA-Expression während der Entwicklung. So können zum Beispiel nur plasmamembranständige Ionenkanäle das Membranpotential beeinflussen oder sekretorische Funktionen übernehmen. Aus diesem Grund wurde die Lokalisation von Kir6.1- und ROMK-Protein während der Sammelrohr-Ontogenese mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern (Kap. 2.2.3.1 und 2.2.3.2) in Ratten-Nieren unterschiedlicher Entwicklungsstadien untersucht.

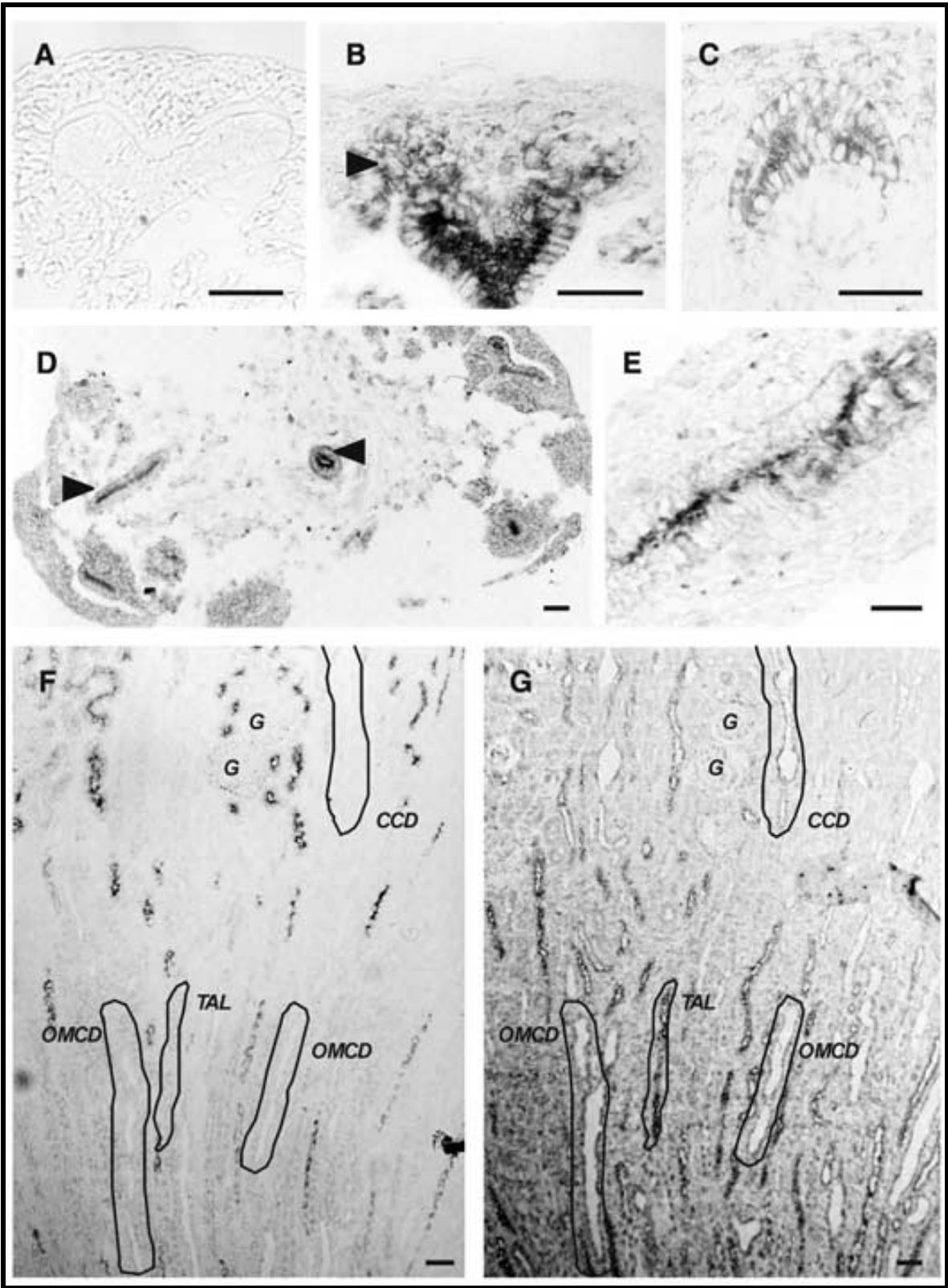
## Kir6.1

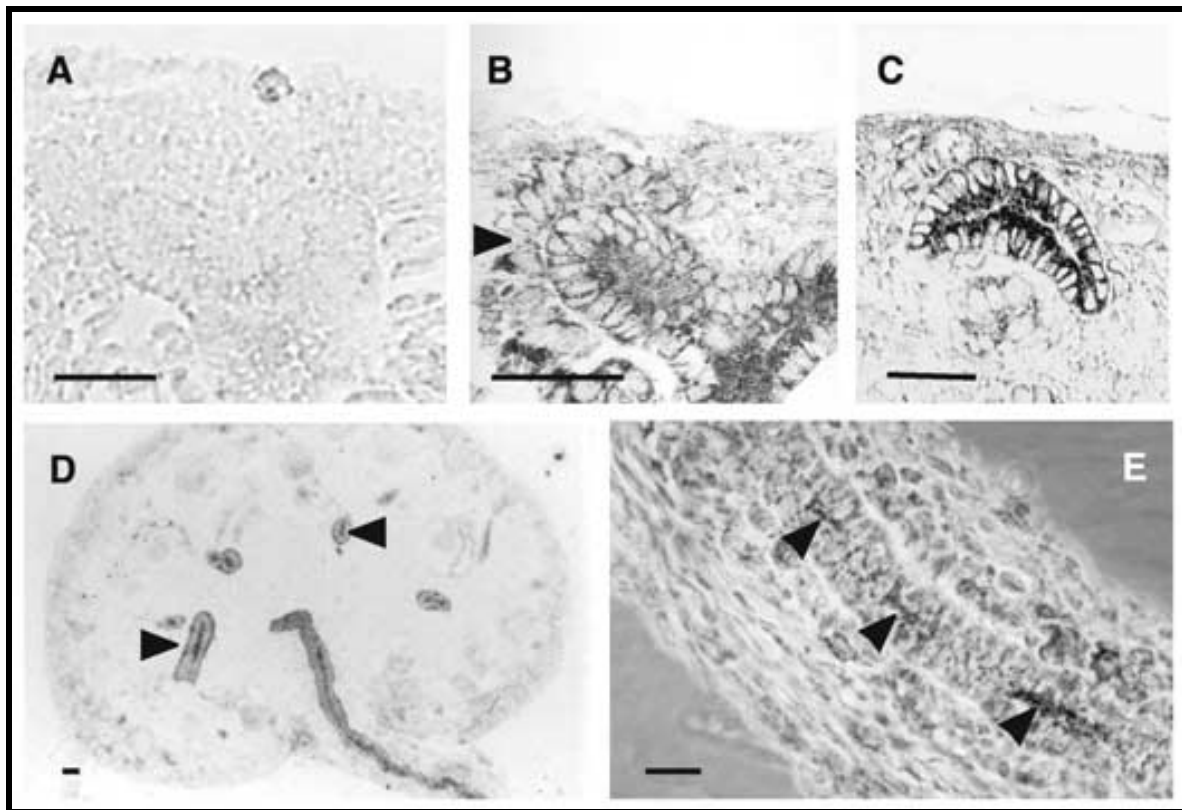
In früh-embryonalen Nieren (E15-17) wurde Kir6.1-Protein im gesamten Sammelrohrsystem exprimiert, von neu entstehenden Ureterknospen (UB) über zentral gelegene Sammelrohre bis zum Ureter (**Abb. 3.4 D,B,E**). Während die Verteilung von Kir6.1-Protein auf den Plasmamembranen von UB und Sammelrohren apolar war, blieb die Expression im Ureter bei E17 auf die apikale Membran beschränkt. Dies spricht für eine zentripetal fortschreitende apikobasolaterale Differenzierung des zentrifugal wachsenden Gang-Systems. Stadium P1 zeigte leichte Kir6.1-spezifische Färbung von UB (**Abb. 3.4 C**), Stadium P7 zeigte keine detektierbare Färbung von Sammelrohren des Kortex (CCD) oder des äußeren Marks (OMCD) (**Abb. 3.4 F**). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die zeitliche Herunterregulation von Kir6.1 im Sammelrohrsystem. In allen Stadien konnte das immunhistochemische Signal vollständig durch die Kir6.1-Antigen-Präadsorption des Antikörpers blockiert werden, was auf die Spezifität des Antikörpers für das immunisierende Kir6.1 Antigen hinweist (**Abb. 3.4 A**).

---

▶

**Abb. 3.4 – Immunlokalisation von Kir6.1-Protein während der Entwicklung des Sammelrohrepithels.** Lichtmikroskopische Aufnahmen, dunkle Färbung entspricht einem positiven immunhistologischen Signal. Balken entsprechen 20 µm. **A:** Ureterknospen (UBs) bei E15. Mit Antigen präadsorbierter Antikörper ergibt kein spezifisches Signal. **B:** UB bei E15. Apolare membranständige Kir6.1-Expression. Pfeil: Zellen einer *mesenchymalen Kondensation*. **C:** UB bei P1 mit apolarer membranständiger Kir6.1-Färbung. **D:** Übersicht einer E15-Niere. Gezeigt sind UB (subkapsulär) und der Querschnitt eines Sammelrohrs (Mitte), die alle eine Kir6.1-spezifische apolare Färbung aufweisen. Pfeile: Sammelrohr-Basalmembranen. **E:** Apikale Prädominanz von Kir6.1-Protein im Ureter bei E17. **F:** Stadium P7. Vertikaler Schnitt durch Nierenkortex und äußeres Mark. Keine Detektion von Kir6.1-Protein in CCD, OMCD und TAL (jeweils exemplarisch nachgezeichnet). Die sichtbare Färbung entspricht Kir6.1-Protein in der apikalen Plasmamembran von Proximalen Tubuli und absteigenden Schenkeln der Henle'schen Schleife (siehe auch Kap. 3.2.1 und Abb. 3.7). Glomeruli = (G). Nephron- und Sammelrohrsegmente wurden mittels ROMK- und Tamm-Horsfall-Protein-Immunhistochemie in Parallelschnitten identifiziert. **G:** Mit ROMK-Antikörper inkubierter Parallelschnitt von F (Stadium P7). Schwache ROMK-Färbung in CCD, stärkere Färbung in OMCD und deutliche Färbung in TAL. Sammelrohre sind auch anatomisch durch ihre weiten Lumina erkennbar.





**Abb. 3.5 – Immunlokalisierung von ROMK-Protein während der Entwicklung des Sammelrohrethels.** Lichtmikroskopische Aufnahmen, dunkle Färbung entspricht einem positiven immunhistologischen Signal. Balken entsprechen 20  $\mu\text{m}$ . **A:** Ureterknospen (UB) bei E15. Mit Antigen präadsorbierter Antikörper ergibt kein spezifisches Signal. **B:** UB bei E15. Apolare ROMK-Expression auf der Plasmamembran. Pfeil: Zellen einer *mesenchymalen Kondensation* exprimieren ROMK. **C:** UB bei P1. Apolare plasmamembranständige Expression von ROMK. **D:** Übersicht einer E15 Niere. Apolare ROMK-Expression in Ureterknospen, in Querschnitten von Sammelrohren und im Ureter. Pfeile: Sammelrohr-Basalmembran. **E:** Bei E17 apikale Prädominanz von ROMK-Protein im embryonalen Ureter.

### Identifizierung der einzelnen Tubulusabschnitte

CCD und OMCD wurden mittels ROMK-Immunhistochemie in Parallelschnitten bestimmt (**Abb. 3.4 G**) (ROMK ist ein Marker distaler Nephronabschnitte und des Sammelrohrs, Xu et al. 1997). Die Expression von Kir6.1 in dicken aufsteigenden Teilen der Henle'schen Schleife (TAL) wurde ausgeschlossen, indem TAL in Parallelschnitten mittels ROMK- und Tamm-Horsfall-Protein-Immunhistochemie identifiziert wurde (**Abb. 3.4 G**; Tamm-Horsfall-Immunhistochemie nicht gezeigt).

Obwohl in TAL und Sammelrohr abwesend, war Kir6.1-Protein in proximalen Nephron-Segmenten exprimiert (**Abb. 3.4 F**) (Details siehe Kap. 3.2.1 Kir6.1-Immunhistochemie im Nephron).

## ROMK

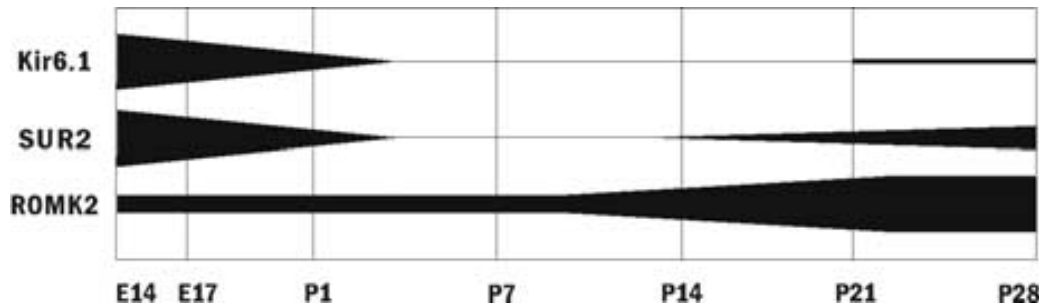
Die ROMK-Immunhistochemie (**Abb. 3.5**) zeigte zur Kir6.1-Immunhistochemie weitgehend analoge Daten: In den Stadien E15, E17 und P1 war die Expression in den Strukturen des Sammelrohrsystems identisch mit der von Kir6.1 (**Abb. 3.5 B-D**). Auch hier war die zelluläre Lokalisation des Kanal-Proteins apolar auf der Plasmamembran. Wie für Kir6.1 war die ROMK-Protein-Expression im Ureter bei E17 polarisiert, i.e. apikal dominant (**Abb. 3.5 E**) (Diskussion in Kap. 4.6). Im Stadium P7 war ROMK im Kortikalen und im Medullären Sammelrohr apikal schwach nachweisbar, wie auch in einer anderen Arbeit (Satlin et al. 1999) und adult beschrieben (Xu et al. 1997) (**Abb. 3.4 G**). In allen Stadien konnte das immunhistochemische Signal vollständig durch die Präadsorption von Antikörper mit Antigen blockiert werden (**Abb. 3.5 A**).

### 3.1.4 Zusammenfassung (K<sup>+</sup>-Kanäle im Sammelrohrepithel)

Die K<sup>+</sup>-Kanal-Untereinheiten Kir6.1 und ROMK werden plasmamembranständig und nicht in Organellen während der Ontogenese des Sammelrohrepithels exprimiert. Hierbei wird die mRNA der Untereinheiten Kir6.1 und SUR2 (die gemeinsam einen K<sup>+</sup>-Kanal bilden können – Interaktion beschrieben in Einführung Kap. 1.3.1 und in Diskussion 4.2.1) in frühen Ureterknospen-Generationen gemeinsam hoch co-exprimiert, und postnatal herunterreguliert (**Synopsis siehe Abb. 3.6**).

ROMK2-mRNA ist in frühen Ureterknospen-Generationen mäßig über der Nachweisgrenze der PCR-Methode exprimiert und steigt erst im Verlauf der Reifung des Kortikalen Sammelrohrs (P7 bis P28) stark an (**Abb. 3.6**). Hierbei kommt es

auch zu einer erneuten Expression von SUR2-mRNA. Ferner ist die ROMK2-mRNA-Expression cAMP-abhängig. Dies legt eine Regulation der ROMK-Expression durch Vasopressin *in vivo* nahe (siehe Diskussion Kap. 4.4.3).



**Abb. 3.6 – Synopsis des zeitlichen Verlaufs der untersuchten  $K^+$ -Kanal-mRNA-Expression in Sammelrohr-Monolayer-Primärkulturen.** Die Expression ist gegen embryonale und postnatale Stadien aufgetragen. Die Dicke der Balken kodiert die Abundanz an mRNA.

Die Diskussion der Expressionsmuster von Kir6.1/SUR2 und ROMK findet in Kap. 4.2.1 bzw. 4.4 statt. Diskussion der Coexpression von SUR2 und ENaC im adulten Sammelrohr siehe Kap. 4.5.1. Diskussion der cAMP-Abhängigkeit der ROMK-mRNA-Expression siehe Kap. 4.4.3.



## 3.2 K<sup>+</sup>-Kanäle im Nephronepithel

Nachdem die differentielle Expression von Kir6.1, SUR2 und ROMK während der Entwicklung des Sammelrohrepithels definiert wurde (Kap. 3.1), sollte die Expression von K<sup>+</sup>-Kanal-Untereinheiten während der Nephron-Entwicklung zwischen der mesenchymal-epithelialen Transformation und dem Anschluss des distalen Tubulus an die Ureterknospe charakterisiert werden. Hierüber existierten keine Daten in der Literatur. Bekannt war hingegen, dass (i) SUR2 (der mögliche Interaktionspartner von Kir6.1) im adulten Proximalen Tubulus exprimiert wird und dass (ii) ROMK im aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife (TAL) stark exprimiert wird (Beesley et al. 1999, Xu et al. 1997). Um zu zeigen, ob Kir6.1/SUR2-Kanäle und ROMK-Kanäle während der Ontogenese des Nephrons exprimiert sind, wurden immunhistochemische Untersuchungen mit Kir6.1- und ROMK-spezifischen Antikörpern durchgeführt, deren Ergebnisse im folgenden gezeigt sind.

### 3.2.1 Kir6.1-Immunhistochemie im Nephron

In allen frühen Stadien der Nephron-Entwicklung wurde Kir6.1-Protein apolar auf den Plasmamembranen der Zellen exprimiert: *mesenchymales Kondensat* (**Abb. 3.4 B**), *Aggregat* (nicht gezeigt), *Komma-förmiger Körper* (**Abb. 3.7 A**), *S-förmiger Körper* (**Abb. 3.7 B,C**). Im S-förmigen Körper zeigte auch der Ort der Vaskulogenese (Barry et al. 1998) ein Kir6.1-positives Signal (**Abb. 3.7 B,C**).

Bei P1, direkt nach der Fusion von Nephron und Ureterknospe (UB), war Kir6.1 auf die apikale Membran junger Proximaler Tubuli (pPT) beschränkt, während die aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife (AL) ungefärbt blieben (**Abb. 3.7 D**). [Auf- und absteigende Schenkel der Henle'schen Schleife wurden anatomisch in Parallelschnitten unterschieden (nach Schmitt et al. 1999), sowie mittels ROMK-Immunhistochemie identifiziert (siehe **Abb. 3.8 D**).]

Bei weiter fortgeschrittenem Nephronwachstum (Stadium P1, tiefere kortikale

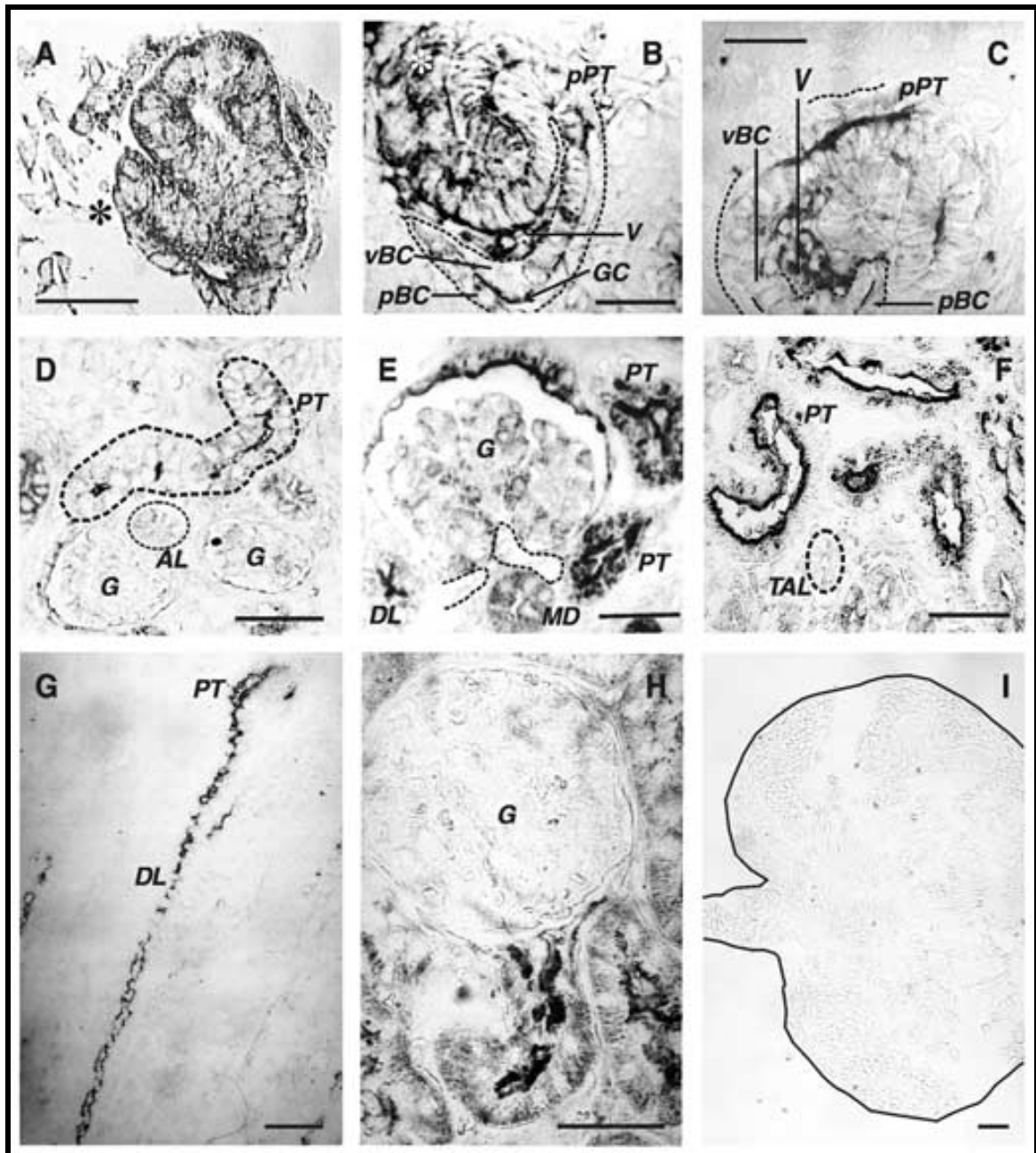
Schichten) war Kir6.1-Protein apikal auf der Bowman'schen Kapsel und im PT exprimiert (**Abb. 3.7 E,F**). Zusätzlich fand sich hier teilweise intrazelluläre Färbung (**Abb. 3.7 E,F**). Auch konnte in den Glomeruli eine perivaskuläre Kir6.1-Expression detektiert werden (**Abb. 3.7 E**), die in späteren Stadien nicht mehr nachweisbar war (**Abb. 3.7 H**). Zellen der Makula Densa (MD) zeigten bei P1 intrazelluläre Kir6.1-Expression. [PT wurden anatomisch über ihre Lokalisation und Morphologie sowie über die Abwesenheit von ROMK-Protein, einem Marker des distalen Tubulus und Kortikalen Sammelrohrs (Xu et al. 1997) identifiziert.]

Bei P7 war Kir6.1-Protein im PT und in den absteigenden Schenkeln der Henle'schen Schleife (DL) detektierbar (**Abb. 3.7 G**). [Diese Strukturen wurden identifiziert durch die Abwesenheit von ROMK-spezifischer Co-Färbung in Parallelschnitten (siehe **Abb. 3.4 F,G**).] Im adulten PT war Kir6.1-Protein klar apikal lokalisiert, wobei sich auch schwache Färbung der basolateralen Membran-Invaginationen zeigte (**Abb. 3.7 H**) (Diskussion hierzu in Kap. 4.3). In allen Stadien konnte das immunhistochemische Signal vollständig durch die Präadsorption des Antikörpers mit Kir6.1-Antigen blockiert werden (**Abb. 3.7 I**).

---

**Abb. 3.7 – Kir6.1-Proteinlokalisierung während der Nephron-Entwicklung.** Lichtmikroskopische Aufnahmen. Dunkle Färbung = positives Signal. Balken = 20 µm. Sterne markieren den proximal-tubulären Pol der Strukturen in A und B.

**A:** *Komma-förmiger Körper* bei E16. Plasmamembranständiges apolares Signal. **B:** *S-förmiger Körper* bei E17. Ubiquitäres, plasmamembranständiges apolares Signal (auch am Ort der Vaskulogenese, V). **C:** Andere Ansicht eines *S-förmigen Körpers* bei E17. **D:** Nephron kurz nach der Fusion mit der Ureterknospe bei P1. Apikales Signal im Proximalen Tubulus (PT, nachgezeichnet). Kein Signal im aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (AL). **E:** Prämatuere Glomeruli bei P1. Die Arteriolen sind nachgezeichnet. Apikales Signal in der Bowman'schen Kapsel (BC), im Proximalen Tubulus (PT) und im absteigenden Teil der Henle'schen Schleife (DL). Intrazelluläres Signal in (BC), (PT) und Zellen der Macula-Densa (MD). Perivaskuläres Signal im Glomerulus. **F:** Apikales Signal im Proximalen Tubulus (PT) bei P1. Kein Signal im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (TAL). **G:** Apikales Signal im Proximalen Tubulus (PT) und im absteigenden Teil der Henle'schen Schleife (DL) bei P7. Keine Expression im Kortikalen und Medullären Sammelrohr (CCD, OMCD) oder im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (TAL).



**H:** Adulter Glomerulus und Proximale Tubuli (PT). Signal deutlich in der apikalen Membran und schwach entlang der Fältelung der basolateralen Plasmamembran. **I:** Antigen-prä-adsorbierter Antikörper als Negativ-Kontrolle ergab kein Signal (hier gezeigt bei E15).

**Abkürzungen:** (*pPT*) primordialer Proximaler Tubulus, (*vBC*) viszerales Blatt der Bowman'schen Kapsel, (*pBC*) parietales Blatt der Bowman'schen Kapsel, (*V*) Ort der Vaskulogenese, (*GC*) glomerulärer Spalt, (*PT*) Proximaler Tubulus, (*AL*) aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife, (*DL*) deszendierender Teil der Henle'schen Schleife, (*TAL*) dicker aufsteigender Schenkel der Henle'schen Schleife, (*MD*) Makula-Densa, (*G*) Glomerulus.

### 3.2.2 ROMK-Immunhistochemie im Nephron

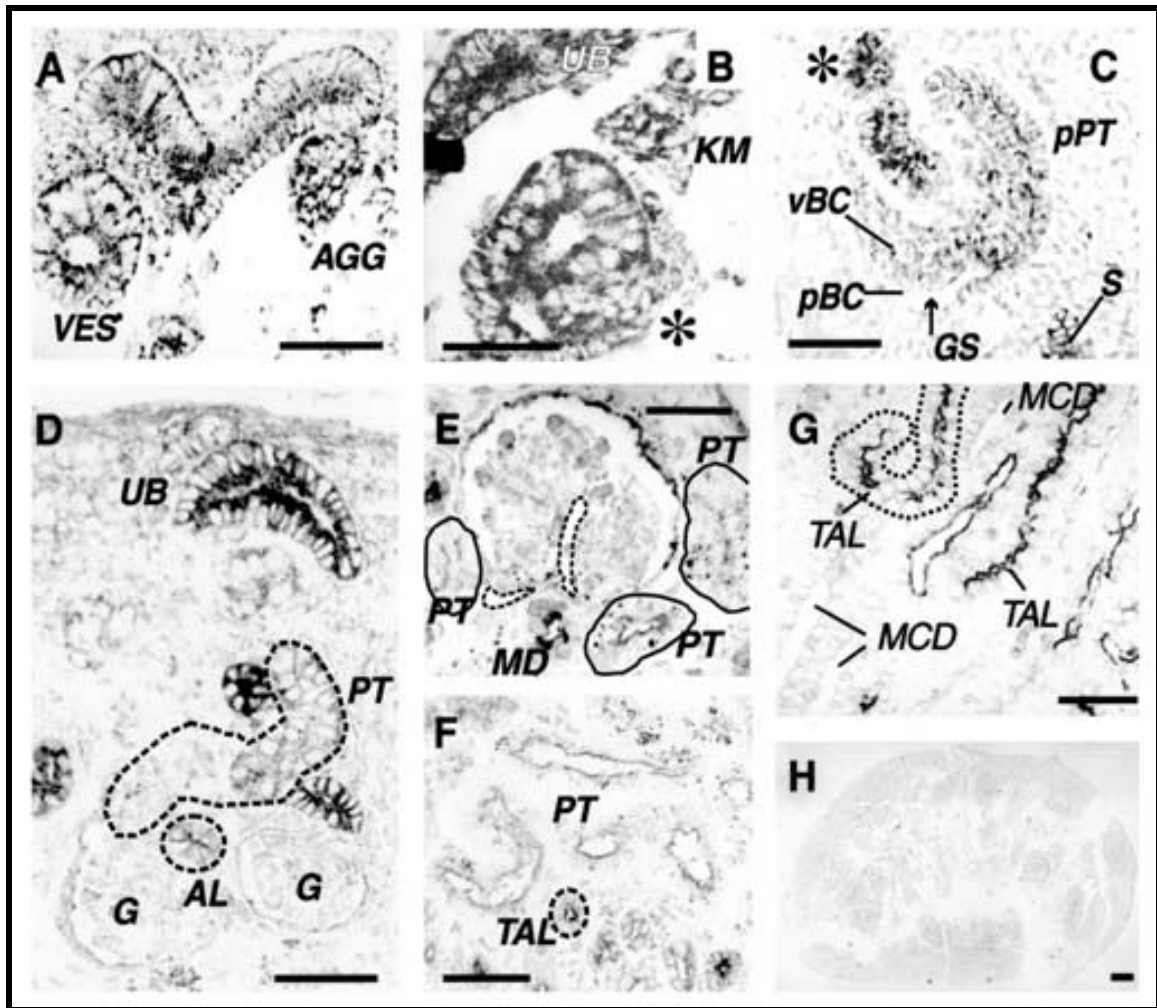
Die ROMK-Expression in den frühen Nephron-Stadien von der *mesenchymalen Kondensation* (KM) (**Abb. 3.5 B**) bis zum *Komma-förmigen Körper* (**Abb. 3.8 A,B**) entsprach der von Kir6.1 (**Abb. 3.4 B und 3.7 A**): plasmamembranständig und apolar. Im *S-förmigen Körper* wurde ROMK im absteigenden Teil nur schwach, im aufsteigenden Teil, der distal Anschluss an das Sammelrohrsystem finden wird, deutlich exprimiert (**Abb. 3.8 C**). Der Ort der Vaskulogenese blieb hierbei ausgespart (vgl. Expression von Kir6.1-Protein an dieser Stelle; **Abb. 3.7 B,C**).

Nach dem Anschluss des Nephrons an UB (P1, subkapsulärer Kortex) erschien ROMK in den aufsteigenden Teilen der Henle'schen Schleife (AL), jedoch nicht mehr im primordialen Proximalen Tubulus (pPT, nachgezeichnet) (**Abb. 3.8 D**). In tiefer gelegenen, reiferen Nephronen bei P1 wurde ROMK am Übergang zwischen parietalem Blatt der Bowman'schen Kapsel (BC) und Proximalem Tubulus (PT), sowie schwach apikal im Proximalen Tubulus detektiert (**Abb. 3.8 E,F**). Deutlich hingegen war ein apikal begrenztes Signal im gesamten dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (TAL) inklusive dem Segment der Makula Densa (MD) auszumachen (**Abb. 3.8 F**). TAL exprimierten im Stadium P5 ROMK-Protein, während Medulläre Sammelrohre (MCD) keine Färbung aufwiesen, wie in der Literatur bereits beschrieben (Zolotnitskaya et al. 1999) (**Abb. 3.8 G**). In allen Stadien konnte das immunhistochemische Signal vollständig durch die Präadsorption des Antikörpers mit ROMK-Antigen blockiert werden (**Abb. 3.8 H**).

---

**Abb. 3.8 – ROMK-Proteinlokalisierung während der Nephron-Entwicklung.** Lichtmikroskopische Aufnahmen. Dunkle Färbung = positives Signal. Balken = 20 µm.

**A:** Apolares plasmamembranständiges Signal im Ureterbaum und in den Nephron-Stadien *Vesikel* und *Aggregat* bei E17. **B:** Apolares plasmamembranständiges Signal in Ureterknospe (UB), *Kondensiertem Mesenchym* (KM) und *Komma-förmigem Körper* bei E17. Stern markiert den proximal-tubulären Pol. **C:** *S-förmiger Körper* bei E17. Das ROMK-Expressions-Muster divergiert erstmals vom Muster der Kir6.1-Expression im gleichen Stadium: ROMK wird im aufsteigenden Schenkel exprimiert, bei nur schwachem apikalem Signal im primordialen Proximalen Tubulus (pPT). Keine Expression im Glomerulären Spalt



(GS) oder am Ort der Vaskulogenese. **D:** Nephrene kurz nach der Fusion mit der Ureterknospe bei P1. Apolares Signal im Sammelrohrsystem (Strukturen mit starker Färbung). Schwaches apikales Signal im aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (AL), nicht im Proximalen Tubulus (PT). **E:** Prämaturer Glomerulus bei P1. Arteriolen gepunktet nachgezeichnet. Apikales Signal in der Makula-Densa-Region (MD) und auf der Bowman'schen Kapsel (BC). Schwaches Signal im Proximalen Tubulus (PT) apikal und intrazellulär. **F:** Apikales Signal im aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (TAL). Kaum Signal im Proximalen Tubulus (PT). **G:** Stadium P5. Signal in der apikalen Membran der aufsteigenden Teile der Henle'schen Schleife (TAL), jedoch nicht im Medullären Sammelrohr (MCD). **H:** Antigen-präadsorbierter Antikörper ergab kein Signal (hier gezeigt bei E15).

**Abkürzungen:** (AGG) Nephron-Aggregat, (VES) Vesikelstadium, (KM) kondensiertes Mesenchym, (UB) Ureterknospe, (pPT) primordialer Proximaler Tubulus, (vBC) viszerales Blatt der Bowman'schen Kapsel, (pBC) parietales Blatt der Bowman'schen Kapsel, (GS) glomerulärer Spalt, (S) Sammelrohr, (PT) Proximaler Tubulus, (AL) aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife, (TAL) dicker aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife, (G) Glomerulus, (MD) Makula-Densa, (MCD) Medulläres Sammelrohr.

### 3.2.3 Zusammenfassung (K<sup>+</sup>-Kanäle im Nephronepithel)

Während der Entwicklung des Nephrons wurden die Proteine Kir6.1 und ROMK anfangs ubiquitär auf den Plasmamembranen exprimiert. Nach der Fusion von Nephron und Ureterknospe entsprach die Expression zunehmend dem adulten Muster: Kir6.1 im Proximalen Tubulus, wie hier erstmals gezeigt; ROMK in TAL, wie auch von anderen Autoren beschrieben (Xu et al. 1997, Zolotnitskaya et al. 1999). Aussagen über die mögliche Bedeutung einer solchen Expression **vor** Aufnahme der für die adulte Funktion relevanten Transportfunktionen der Niere bedürfen weiterer pharmakologischer, physiologischer und zellbiologischer Experimente (z.B. Kanal-Modifikation, *Gene-Targeting*) (diskutiert in Kap. 4.6 und 4.7).

**Die Diskussion der Kir6.1/SUR2 und ROMK-Expressionsmuster findet in Kap. 4.2.1 und 4.3, bzw. 4.4 statt.**

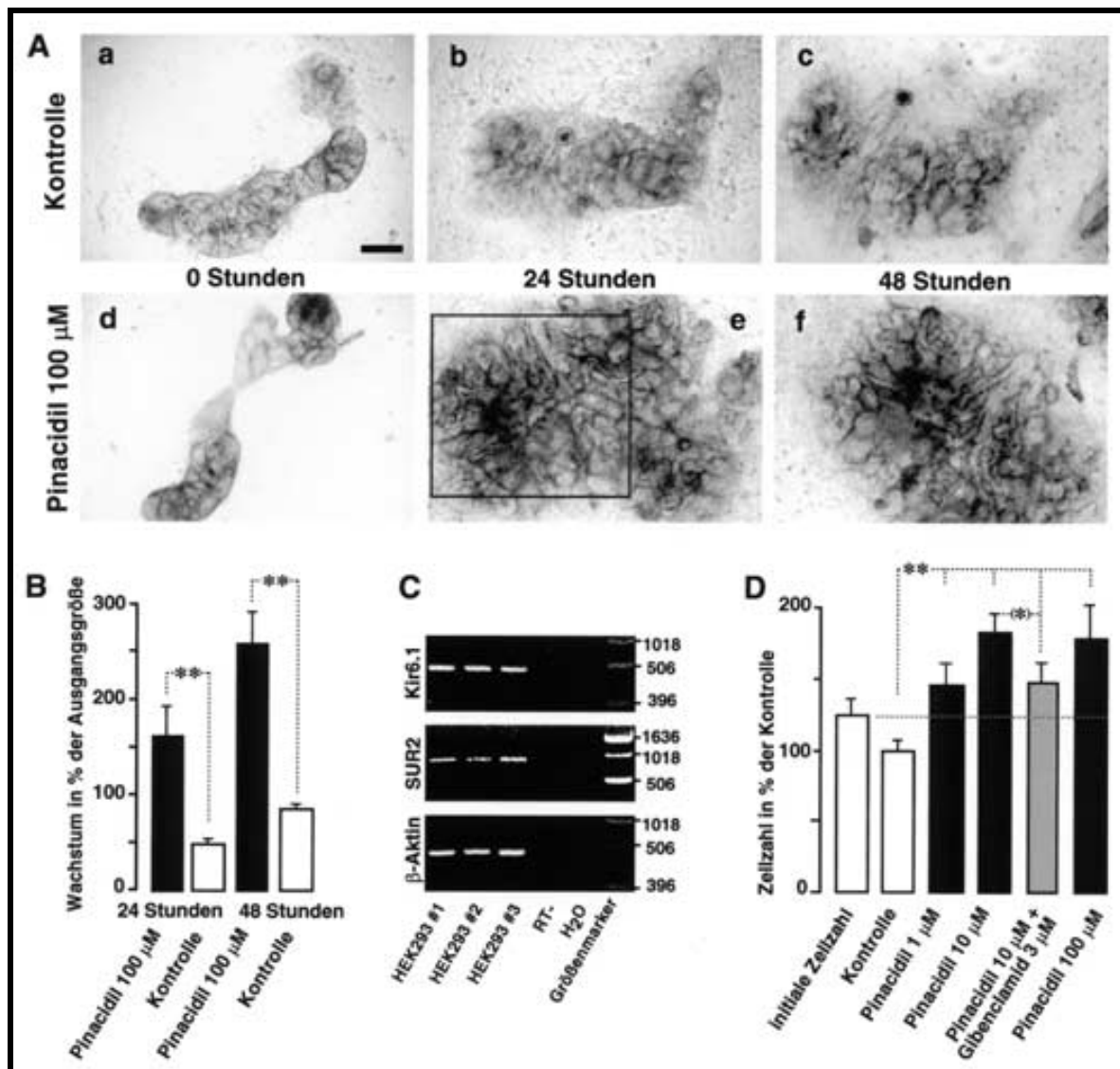
### 3.3 Funktion von $K_{ATP}$ -Kanälen (Kir6.1/SUR2(B)) in der Nephrogenese

#### 3.3.1 Effekte der $K_{ATP}$ -Kanalaktivierung auf Nephron-Kulturen *in vitro*

$K_{ATP}$ -Kanal-Untereinheiten wurden während der Genese des Sammelrohrepithels (Kir6.1- und SUR2-mRNA) sowie während früher Phasen der Nephron-Entwicklung (Kir6.1-Protein) exprimiert und anschließend herunterreguliert (Kap. 3.1 und 3.2). Diese frühe und entwicklungsabhängige Expression könnte auf eine entwicklungsspezifische Aufgabe von  $K_{ATP}$ -Kanälen hinweisen. Um dies zu testen, wurde die Auswirkung des  $K^+$ -Kanalöffners *Pinacidil*, eines spezifischen Modulators der Aktivität von  $K_{ATP}$ -(Kir6.x/SUR2)-Kanälen (Ashcroft und Gribble 2000) auf das Wachstum von Nephronen und Ureterknospen *in vitro* untersucht. Hierzu wurde ein bereits etabliertes Nephrogenese-Modell der Maus (siehe Kap. 2.2.1.3) verwendet. Die Größe dieser UB/Nephron-Kulturen wurde direkt **vor** sowie **nach** 24- und 48-stündiger Behandlung mit Pinacidil (100  $\mu$ M) oder Kontroll-Medium bestimmt (**Abb. 3.9 A**). Die lichtmikroskopische Auswertung zeigte, dass Pinacidil-Kulturen im Vergleich zu den Kontrollen schneller wuchsen und eine größere Anzahl an tubulären Strukturen aufwiesen, die überdies morphologisch weiter fortgeschritten waren:

Zu Beginn der Experimente wiesen die Kulturen beider Gruppen eine durchschnittliche Größe von ca. 2 mm<sup>2</sup> auf. Nach 24-stündiger Behandlung hatten Pinacidil-Kulturen ihre ursprüngliche Größe mehr als verdoppelt (150%), während Kontroll-Kulturen nur um 50% an Größe zugenommen hatten (**Abb. 3.9 B**).

Nach 48 Stunden waren Pinacidil-behandelte Kulturen um 260% gewachsen (Kontrollen 80%) (**Abb. 3.9 B**). Insgesamt führte somit das Verabreichen des  $K_{ATP}$ -Kanalöffners zu einer 3-fachen Zunahme der Wachstumsrate (i.e., Zunahme der Kultur-Größe pro 24 Stunden) gegenüber den Kontrollen ( $p < 0.01$ ) (**Abb. 3.9 B**). Diese Daten sprechen dafür, dass die Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen die Zell-Proliferation steigerte.



**Abb. 3.9 – Effekt von *Pinacidil* und *Glibenclamid* auf das Wachstum von Nierenepithelien *in vitro*.** **A:** Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen von UB/Nephronkulturen. Der Balken in (a) entspricht einer Größe von 100 µm und gilt für alle Teilabbildungen. Gezeigt ist eine Kultur aus der Kontrollgruppe (**a-c**) und eine Kultur aus der *Pinacidil*-Gruppe (**d-f**), aufgenommen direkt vor der Zugabe von *Pinacidil* und nach 24 bzw. 48 Stunden. Aus dem in Bild (e) eingerahmten Kultur-Teilausschnitt ist zum Zeitpunkt 48 h die in Bild (f) sichtbare Kulturfläche hervorgegangen. Mit *Pinacidil* behandelte Kulturen zeigten eine schnellere Größenzunahme als Kontrollen. **B:** Statistik der Wachstumsraten von UB/Nephronkulturen, jeweils nach 24 und 48 Stunden bestimmt (siehe Methoden Kap. 2.2.1.3). *Pinacidil*-Gruppen sind schwarz, Kontrollgruppen hell dargestellt. Säulen zeigen das Wachstum in % der ursprünglichen Größe vor *Pinacidil*-Behandlung. Mittelwerte ± SE, (n = von links nach rechts: 9, 5, 6, 6), \*\* p < 0.01, Welch-Annäherung (Welch 1959). ►



### 3.3.2 Effekte der $K_{ATP}$ -Kanal-Modulation auf das Wachstum von HEK293-Zellen

Die embryonale Nierenzelllinie HEK293 exprimiert Markermoleküle der Entwicklung des kondensierten Mesenchyms und des S-förmigen Körpers wie z.B. Pax-2 und WT-1 (Torban und Goodyer 1998). Ferner konnte mit RT-PCR die endogene Expression von Kir6.1- und SUR2-mRNA in HEK-Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 3.9 C**). Es war das Ziel, die Pharmakologie und die Kir6.1/SUR2-Spezifität der beobachteten Wachstumsantwort von *in-vitro*-Nephron-Kulturen auf Pinacidil (**Abb. 3.9 A,B**) genauer zu charakterisieren. Daher wurden HEK293 Zellen in serumfreiem Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von Pinacidil (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 100  $\mu$ M) und dem  $K^+$ -Kanalblocker *Glibenclamid* (0  $\mu$ M und 3  $\mu$ M) kultiviert und die Zellzahl der Kulturen mittels **Fluoreszenz-Aktiviertem-Cell-Sorting** (FACS) quantifiziert und anschließend statistisch ausgewertet. Wie in **Abb. 3.9 D** gezeigt, steigerte Pinacidil in den niedrigen Konzentrationen 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M die Zellzahl nach 24 Stunden um den Faktor 1,5 bzw. 1,8. Eine Konzentration von 100  $\mu$ M Pinacidil führte zu keinem weiteren Effekt. Die zusätzliche Gabe von Glibenclamid (3  $\mu$ M) zu Pinacidil (10  $\mu$ M) führte zu einer signifikanten Abschwächung des stimulatorischen Effekts von Pinacidil.

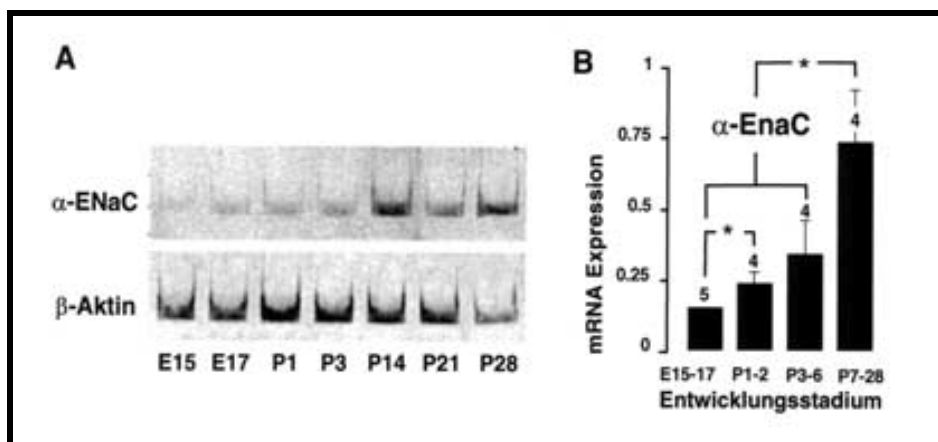
**Die Diskussion der funktionellen Bedeutung von Kir6.1/SUR2-( $K_{ATP}$ )-Kanälen in der Nephrogenese findet in Kap. 4.2.2 und 4.6 statt.**

---

◀ **C:** HEK293-Zell-Proliferationsmodell. Die RT-PCR aus 3 unabhängigen HEK293-Zell-Präparationen zeigt die endogene mRNA-Expression von Kir6.1, SUR2, sowie des Housekeepers  $\beta$ -Aktin. Produktlängen: 447 Bp, 685 Bp, bzw. 446 Bp. (RT-) und ( $H_2O$ ): Negativ-Kontrollen mit RNA bzw. Wasser als Matrize. Rechter Gel-Rand: molekularer Größenmarker in Bp. **D:** Wachstum von HEK293-Zellkulturen über 2 Tage in Abhängigkeit von der Pinacidil-Dosis (Zellquantifizierung per FACS-Analyse). Weiße Säulen: initiale Zellzahl und Zellzahl nach 1 Tag serumfreier Behandlung (Kontrolle, welche die Größe 100% definiert). Schwarze Säulen: Für 1 Tag mit Pinacidil (1-100  $\mu$ M) behandelte Gruppen. Graue Säule: Behandlung mit *Glibenclamid* (3  $\mu$ M) und Pinacidil (10  $\mu$ M). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE, (n = 6 oder 12 pro Behandlungsgruppe), \*\*  $P \leq 0.01$  (zweiseitiger unpaariger t-Test), \*  $P \leq 0.05$  (einseitiger unpaariger t-Test).

## 3.4 Na<sup>+</sup>-Kanäle im Sammelrohrepithel

### 3.4.1 $\alpha$ -ENaC-mRNA-Expressionsmuster



**Abb. 3.10 – RT-PCR. Entwicklungsabhängige  $\alpha$ -ENaC-mRNA-Expression in Sammelrohrepithel-Monolayer-Primärkulturen.** **A:** Oberes Gel:  $\alpha$ -ENaC-spezifische PCR-Produkte (Länge: 254 Bp). Unteres Gel: entsprechende PCR-Produkte des Housekeepers  $\beta$ -Aktin (Länge: 351 Bp). Repräsentative Experimente sind gezeigt. PCR-Negativ-Kontrollen mit H<sub>2</sub>O und RNA als Matrize waren negativ (nicht gezeigt). **B:** Quantifizierung und Statistik der gemessenen  $\beta$ -Aktin-normalisierten Mengen an  $\alpha$ -ENaC-PCR-Produkt in verschiedenen Stadien. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE in arbiträren Einheiten. Die Zahl der Experimente für jedes Stadium ist oberhalb der jeweiligen Säule angegeben. \*  $P \leq 0.05$ , Mann-Whitney-Test.

Im adulten Kortikalen Sammelrohr erfolgt die Rückresorption von Na<sup>+</sup> durch den apikalen epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanal (ENaC), der sich aus der porenbildenden Einheit  $\alpha$ -ENaC und den regulatorischen Untereinheiten  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC zusammensetzt (beschrieben in Kap. 1.3.2 und 1.4). Ureterknospen und junge Kortikale Sammelrohre weisen keine ENaC-Ganzzell-Ströme auf, was auf die Abwesenheit von ENaC-messenger-RNA oder eine Suppression der Kanalfunktion zurückzuführen sein könnte (Huber et al. 1999).

Daher wurde hier die zeitliche Expression von  $\alpha$ -ENaC-mRNA während der Entwicklung des Sammelrohrepithes mittels quantitativer RT-PCR an Monolayer-

Primärkulturen untersucht. Da preliminäre Untersuchungen gezeigt hatten, dass die quantitative mRNA-Expression aller drei Untereinheiten von ENaC parallel verlief, wurde nur die Expression von  $\alpha$ -ENaC-mRNA als repräsentativer Marker statistisch ausgewertet.

Das Ergebnis (**Abb. 3.10**) zeigte, dass  $\alpha$ -ENaC-mRNA bereits in embryonalen Stadien exprimiert wurde. Mit der zeitlichen Entwicklung erfolgte eine kontinuierliche Zunahme der mRNA-Expression, wobei ein deutlicher Anstieg zwischen den späten Ureterknospen- und den CDD-Stadien stattfand (Faktor 2-3).

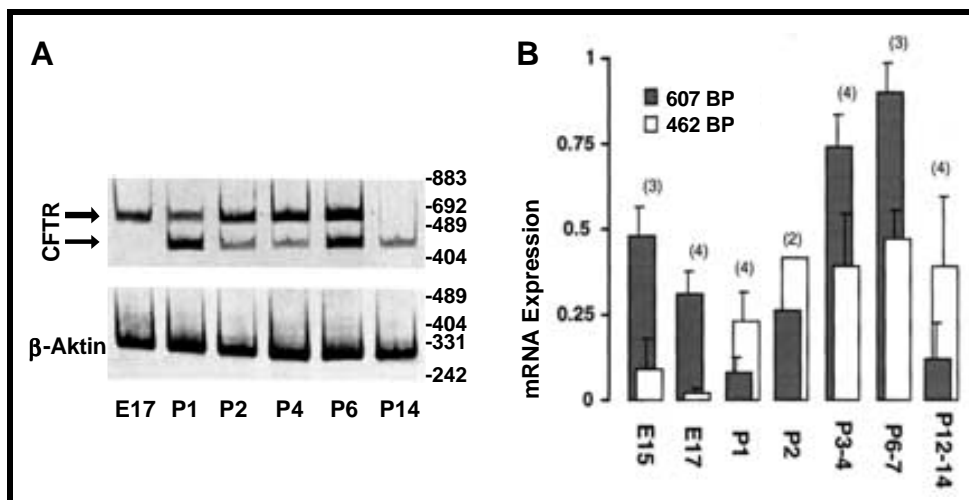
Diese Daten belegen, dass ENaC-mRNA lange vor dem Auftreten messbarer Na<sup>+</sup>-Ganzzellströme und vor dem Beginn der physiologischen Na<sup>+</sup>-Resorption vorhanden ist.

**Die Diskussion der ENaC-Expressionsmuster und ihrer funktionellen Bedeutung findet in Kap. 4.5.1 statt.**

### 3.5 Cl<sup>-</sup>-Kanäle im Sammelrohrepithel

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass insbesondere junge UB-Zellen (E17) Ganzzellstrome mit einer hohen fraktionellen Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit besitzen (Huber und Horster 1996). Um diese elektrophysiologischen Ergebnisse genauer einordnen zu können, wurde hier die temporale mRNA-Expression von Cl<sup>-</sup>-Kanälen in UB/CCD-Monolayer- Primärkulturen charakterisiert. Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeiten sind unter anderem für die Zell-Volumenregulation notwendig, eine Aufgabe, die gerade während der Zell-Proliferation von großer Bedeutung ist (siehe Diskussion Kap. 4.2.2).

#### 3.5.1 CFTR-mRNA-Expressionsmuster



**Abb. 3.11 – RT-PCR. Entwicklungsabhängige CFTR-mRNA-Expression in Sammelrohrepithel-Monolayer-Primärkulturen.** **A:** Oberes Gel: spezifische PCR-Produkte für Wildtyp-CFTR (obere Bande, 607 Bp) und TNR-CFTR (untere Bande, 462 Bp). Unteres Gel: entsprechende Produkte des Housekeepers  $\beta$ -Aktin (351 Bp). Repräsentative Experimente sind gezeigt. Rechter Gel-Rand: molekularer Größenmarker in Bp. Kontrollen mit H<sub>2</sub>O und RNA als Matrize waren negativ (nicht gezeigt). **B:** Quantifizierung der gemessenen  $\beta$ -Aktin-normalisierten Mengen an CFTR-PCR-Produkt in verschiedenen Stadien. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE in arbiträren Einheiten. Die Zahl der Experimente pro Stadium ist oberhalb der jeweiligen Säule angegeben. Dunkle Säulen kodieren die Expression von Wildtyp CFTR, helle Säulen die der kürzeren Variante TNR-CFTR.

Der *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) (Einführung in Kap. 1.3.3) bildet einen Cl-Kanal und fungiert daneben als wichtiges Regulatorprotein von ENaC- oder von ORCC-Cl-Kanälen, die während der Nephrogenese exprimiert werden (Diskussion hierzu in Kap. 4.5.1 und 4.5.2). Daher wurde hier die Expression von CFTR-mRNA in UB/CCD-Monolayer-Primärkulturen der Stadien E15 bis P14 mittels quantitativer RT-PCR bestimmt.

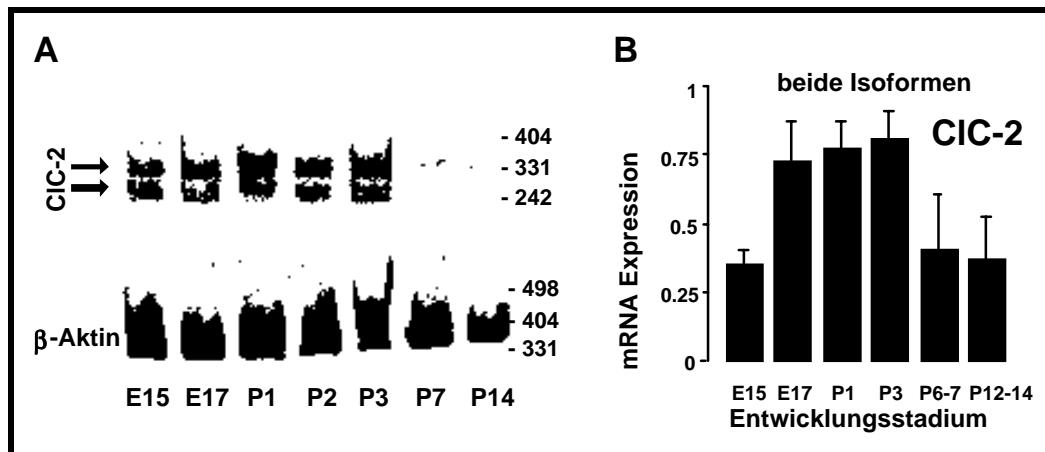
Die verwendeten PCR-Primer lagen in den Exons 13 und 14 des CFTR-mRNA-Moleküls und detektierten zwei mRNA-Varianten von CFTR: (i) CFTR-Wildtyp-mRNA (WT-CFTR; Produktlänge 607 Bp); (ii) Die alternative Splicevariante TNR-CFTR (Produktlänge 462 Bp), bei der das Fehlen der ersten 145 Basenpaare von Exon 14 die Kodierung neuer Aminosäuren und eines vorzeitigen STOP-Codons bedingt, was zur Entstehung eines verkürzten CFTR-Proteins führt (Huber et al. 1998a). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente sind in **Abb. 3.11** gezeigt. Die beiden PCR-Produkte wurden differentiell exprimiert:

WT-CFTR-mRNA wies einen zweigipfeligen Verlauf auf (**B**): in embryonalen Ureterknospen-Generationen hoch exprimiert, war WT-CFTR am Tag P1 um den Faktor 5 herunterreguliert, und während der ersten Lebenswoche erneut hoch exprimiert (bis zum 10-fachen des P1-Wertes). In der zweiten Lebenswoche war WT-CFTR-mRNA wieder auf das Niveau des P1-Werts gesunken.

Die Expression von TNR-CFTR-mRNA nahm zwischen den embryonalen Stadien E15-17 und postnatal P2 im Mittel um einen Faktor von mindestens 5 zu und blieb während des restlichen Beobachtungszeitraumes (bis P14) konstant auf diesem Niveau, was auf den Erwerb von TNR-CFTR mit der Geburt hinweist.

Auffallend war, dass für nicht-sättigende CFTR-PCR-Reaktionen 1/10 der cDNA-Menge wie für die Detektion der anderen untersuchten Ionenkanal mRNAs benötigt wurde. Dies spricht für die - auch andernorts beschriebene - hohe Kopienanzahl von CFTR im Sammelrohrepithel (Todd-Turla et al. 1996).

### 3.5.2 CLC-2-mRNA-Expressionsmuster



**Abb. 3.12 – RT-PCR. Entwicklungsabhängige CLC-2-mRNA-Expression in Sammelrohrepithel-Monolayer-Primärkulturen.** **A:** Oberes Gel: CLC-2-spezifisches PCR-Produkt. Es wurden zwei unterschiedlich lange Splice-Varianten detektiert: 372 Bp und 307 Bp Länge. Unteres Gel: entsprechende Produkte des Housekeepers  $\beta$ -Aktin (351 Bp). Repräsentative Experimente sind gezeigt. Rechter Gel-Rand: molekularer Größenmarker in Bp. PCR-Negativ-Kontrollen mit  $H_2O$  und RNA als Matrizze waren negativ (nicht gezeigt). **B:** Quantifizierung.  $\beta$ -Aktin-normalisierte Mengen an CLC-2-Produkt sind gegen das Entwicklungsstadium aufgetragen. Es wurden jeweils die Banden beider Isoformen addiert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE in arbiträren Einheiten ( $n = 4$  pro Stadium).

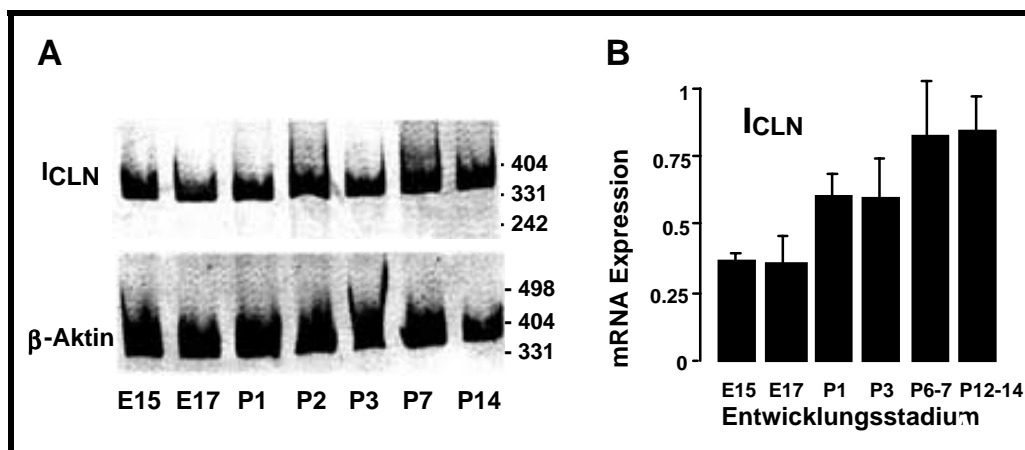
CLC-2 (beschrieben in Kap. 1.3.3) wird während der (ähnlich der Sammelrohr-Entwicklung verlaufenden) Bronchial-Entwicklung exprimiert. Patch-clamp-Ergebnissen zufolge besitzen Monolayer-Primärkulturen des UB-Epithels (E17-P6)  $Cl^-$ -Leitfähigkeiten, die Charakteristika von CLC-2 zeigen (Huber und Horster 1996, Huber et al. 1998b). Um diesen Befund zu verifizieren, wurde hier die Expression von CLC-2-mRNA in Ureterknospen- und Sammelrohrepithel-Monolayer-Primärkulturen der Stadien E15 bis P14 durch quantitative RT-PCR bestimmt.

Die verwendeten Primer amplifizierten in allen untersuchten Stadien anstatt eines PCR-Produkts von 375 Basenpaaren Länge je ein PCR-Produkt der Größe 372 und der Größe 309 Bp (**Abb. 3.12 A**). Durch Sequenzierung beider Produkte wurde die Spezifität für CLC-2-mRNA gezeigt. Ferner konnte gezeigt werden, dass beide Produkte an den Positionen 2398-2400 eine Deletion von 3 Basen aufwiesen, was

das Abweichen des 372 Bp Produkts von der erwarteten Sequenz von 375 Bp erklärt. Das 309 Bp lange PCR-Produkt wies eine Deletion von 60 Basen an den Positionen 2407 bis 2466 auf. Dies führt zu einer *nicht*-Leseraster-verschiebenden Deletion von 20 Aminosäuren innerhalb der D12-, D13-Domänen des C-Terminus von CLC-2-Protein.

Da die beiden PCR-Produkte in jedem Stadium im gleichen Mengenverhältnis zueinander auftraten, wurden ihre Mengen jeweils addiert und statistisch ausgewertet (**Abb. 3.12 B**). Es wurde folgender Expressionsverlauf von CLC-2-mRNA detektiert: von E15 auf P1 bis P3 nahm die Expression um den Faktor 2 zu, und erreichte in den Stadien P7 bis P12 wieder den E15-Ausgangswert. Diese Daten zeigen, dass die Expression von CLC-2-mRNA genau umgekehrt zu der von Wildtyp-CFTR (siehe oben in Kap. 3.5.1) verlief.

### 3.5.3 ICLN-mRNA-Expressionsmuster



**Abb. 3.13 – RT-PCR. Entwicklungsabhängige ICLN-mRNA-Expression in Sammelrohrepithel-Monolayer-Primärkulturen.** **A:** Oberes Gel: ICLN-spezifisches PCR-Produkt (Länge 326 bp). Unteres Gel: entsprechende PCR-Produkte des Housekeepers  $\beta$ -Aktin (Länge 351 Bp). Repräsentative Experimente sind gezeigt. Rechter Gel-Rand: molekularer Größenmarker in Bp. PCR-Reaktionen mit  $H_2O$  und RNA als Matrize waren negativ (nicht gezeigt). **B:** Quantifizierung.  $\beta$ -Aktin-normalisierte Mengen an ICLN-PCR-Produkt sind gegen das Entwicklungsstadium aufgetragen. Mittelwerte  $\pm$  SE in arbiträren Einheiten ( $n = 4$ ).

Patch-clamp-Experimente haben gezeigt, dass perinatale Ureterknospen (P1-6) und Sammelrohrepithelien (P9-14) neben CLC-2-Strömen eine schwellungsaktivierte Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit exprimieren, die ICLn-ähnliche Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeiten aufweist (Huber und Horster 1998). (Einführung von CLC-2 und ICLn in Kap. 1.3.3.) Um diese elektrophysiologischen Daten zu verifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA-Expression von ICLn mittels RT-PCR an Sammelrohrepithel- Monolayer-Primärkulturen der Stadien E15 bis P14 quantifiziert (**Abb. 3.13**).

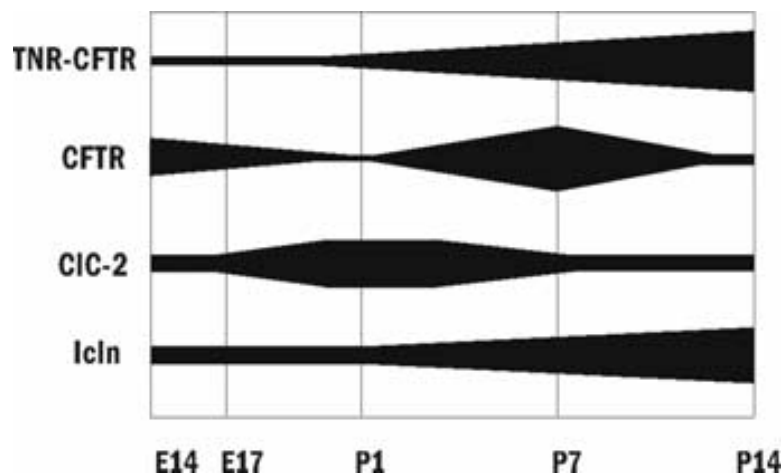
ICLn-spezifisches PCR-Produkt wurde vom Stadium E15 bis zum Stadium P14 kontinuierlich zunehmend detektiert (**Abb. 3.13 B**), wobei sich die Expression zwischen E15 und P12-14 verdoppelte. Diese Daten legen nahe, dass die in UB und CCD gemessenen volumenregulatorischen Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeiten zumindest zu einem Teil durch ICLn hervorgerufen sein könnten (Diskussion hierzu siehe Kap. 4.5.3).



### 3.5.4 Zusammenfassung (Cl-Kanäle im Sammelrohrepithel)

Die mRNA für das verkürzte CFTR-Molekül TNR-CFTR und für das mit der Aktivität von schwellungsaktivierten Cl<sup>-</sup>-Strömen assoziierte ICLn-Protein wurde mit der Sammelrohrentwicklung zunehmend exprimiert. Dies ist in Einklang mit der vermuteten *Housekeeper*-Funktion beider Gene (**diskutiert in Kap. 4.5**).

Wildtyp-CFTR und CLC-2 hingegen wurden vor allem während des gesamten Ureterknospen-Stadiums exprimiert und in der postnatalen Sammelzellreifung herunterreguliert. Adulte Sammelrohr-Hauptzellen exprimieren zwar noch geringe Mengen an CFTR-mRNA und -Protein (Todd-Turla et al. 1996, Devuyst et al. 1996), jedoch nicht mehr CLC-2-mRNA (Obermüller et al. 1998). **Details siehe Diskussion Kap. 4.5.2 und 4.5.3.**



**Abb. 3.14 – Synopsis des zeitlichen Verlaufs der untersuchten Cl-Kanal-mRNA-Expression in Sammelrohr-Monolayer-Primärkulturen.** Die Expression ist gegen embryonale und postnatale Stadien aufgetragen. Die Dicke der Balken kodiert die Abundanz an mRNA.

Die Diskussion der CFTR-, CLC-2- und ICLn-Expressionsmuster sowie ihrer funktionellen Bedeutung findet in Kap. 4.5 statt.



## Kapitel 4

# Diskussion

### 4.1 Ergebnisse aus Monolayer-Primärkulturen

#### 4.1.1 Validität des Modells

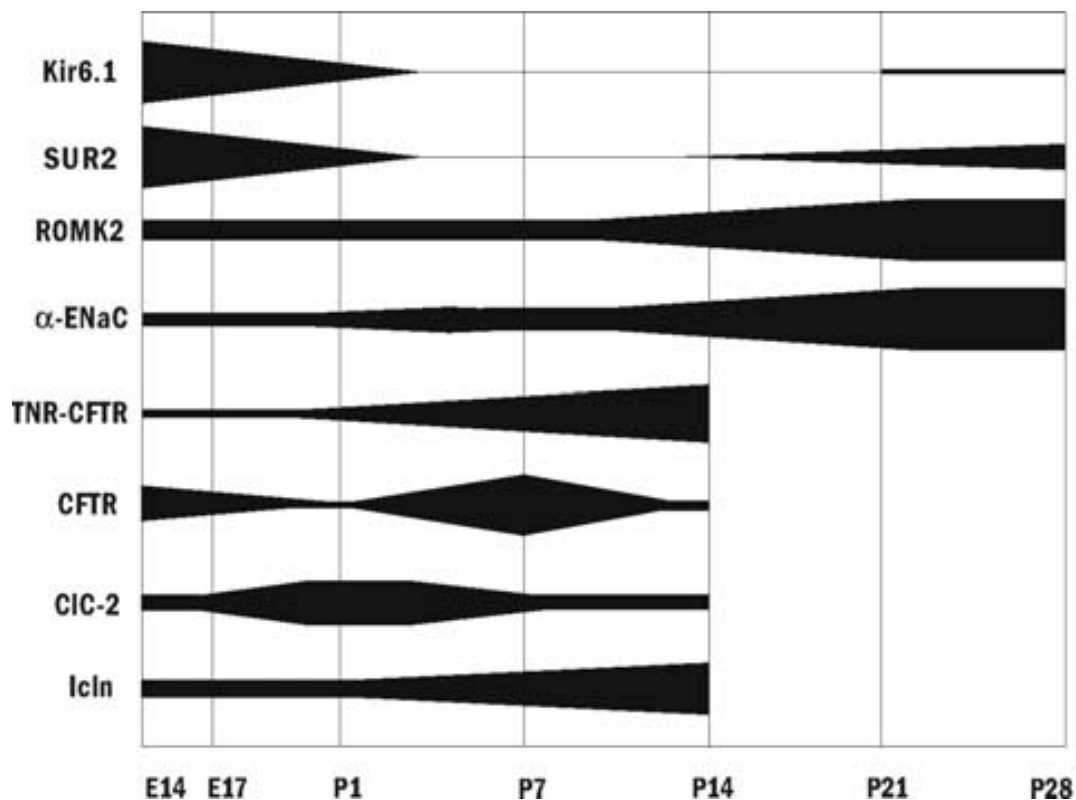
Für die RT-PCR-Analyse wurden die periphersten UB und Kortikalen Sammelrohre verschiedener Entwicklungsstadien aus Rattennieren disseziert und als Monolayer-Primärkulturen gezüchtet. Die Validität dieses Modells wurde in einer Reihe von Experimenten bestätigt: Kultivierte Sammelrohrepithelien exprimieren auf Proteinebene Differenzierungsmarker des epithelialen Zelltyps, z.B. E-cadherin und  $\beta$ -catenin (Huber et al. 2000). In der Raster-Elektronenmikroskopie weisen kultivierte Zellen aus den Stadien E14 bis P21 erwartungsgemäß den Phänotyp der CCD-Hauptzelle auf (Huber und Horster 1996). Wie native CCD-Zellen besitzen auch postnatale Stadien kultivierter Sammelrohrepithelien in elektrophysiologischen Untersuchungen einen apiko-basolateralen Differenzierungstyp (Huber und Horster 1996). Ferner sind die elektrischen Eigenschaften zwischen nativen und kultivierten UB/CCD-Zellen identisch (Huber und Horster 1996, Huber und Horster 1998, Huber et al. 2000). Native und kultivierte Zellen exprimieren funktionelle Differenzierungsmarker in identischen Zeitläufen, wie für den epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal ENaC und für CFTR gezeigt wurde: **ENaC**: Daten aus Kap. 3.4.1, Huber et al. 1999, Vehaskari et al. 1998, Watanabe et al. 1999; **CFTR**: Daten aus Kap. 3.5.1, Devuyst et al. 1996, Huber et al. 1998a.

#### 4.1.2 Interpretation der gewonnenen Daten

Der Vergleich früher (P7-8) und später (P21-28) CCD-Stadien liefert Informationen über den Erwerb von Funktionen des adulten CCD, z.B.  $\text{Na}^+$ -Reabsorption. Der Vergleich verschiedener UB-Stadien bringt Informationen über die Unterschiede zwischen frühen (E14 bis P1) und späten (P1 bis 6) UB-Generationen.

### 4.1.3 Synopsis der Expressionsmuster von Ionenkanal-mRNA im Sammelrohr

Die zeitlichen Verläufe der mRNA-Expression in Sammelrohrreepithel-Monolayer-Primärkulturen lassen sich wie in **Abb. 4.1** dargestellt zusammenfassen. Alle untersuchten mRNAs waren schon in früh-embryonalen Stadien detektierbar. Aufgrund ihrer mRNA-Expression als **embryonal** charakterisiert sind die K<sup>+</sup>-Kanal-Untereinheiten Kir6.1 und SUR2, sowie die Cl-Kanäle WT-CFTR, CLC-2 und ICLn. Die Expression von ROMK2 und  $\alpha$ -ENaC steigt erst nach Abschluss der Morphogenese während der postnatalen Reifung des Sammelrohrs an. Bis zum adulten Stadium müssen diese beiden funktionell sehr bedeutsamen apikalen Kanäle der Sammelrohr-Hauptzelle erworben sein (Giebisch 1995). TNR-CFTR- und ICLn-mRNA nehmen ebenfalls während der postnatalen Reifung zu. Die Diskussion der einzelnen Befunde findet sich in den nachfolgenden Kapiteln.

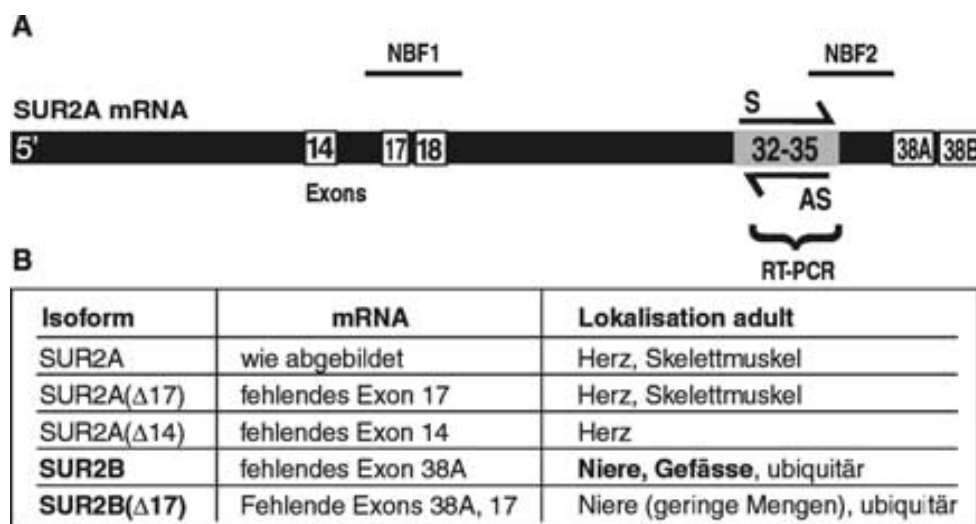


**Abb. 4.1 – Zeitlicher Verlauf der untersuchten Ionenkanal-mRNA-Expression in Sammelrohr-Monolayer-Primärkulturen.** Die Balkendicke kodiert die mRNA-Abundanz.

## 4.2 K<sub>ATP</sub>-Kanäle in der Nephrogenese

### 4.2.1 Expressionsmuster

Kir6.1 und SUR2-mRNAs zeigten sich in jungen Ureterknospen-Generationen co-exprimiert und waren anschließend herunterreguliert. In der Immunhistochemie war die Expression von Kir6.1-Protein in der gesamten Plasmamembran von Ureterknospen und jungem Sammelrohrepithel zu finden. Auch hier bestätigte sich die zeitliche Herunterregulation von Kir6.1-Protein nach P1. Die in der PCR aus Sammelrohrepithelien verwendeten Primer ermöglichten keine Differenzierung zwischen der Expression der Isoformen SUR2A und SUR2B (zusammengefasst in **Abb. 4.2**).



**Abb. 4.2 – Alternatives Splicing und RT-PCR-Detektion von SUR2-mRNA.** **A:** Skizze von SUR2A, dem längsten SUR2-mRNA-Molekül. Die Bezeichnungen SUR2 und SUR2A werden in der Literatur synonym verwendet. Alternativ gesplice Exons (helle Kästchen) und Exons 32-35, aus denen das PCR-Produkt amplifiziert wurde (graues Kästchen), sind gezeigt. Ferner sind die Positionen der Nukleotid-bindenden Regionen NBF-1 und NBF-2 gekennzeichnet. **B:** Die Tabelle fasst die Zusammensetzung und Gewebs-Verteilung der bis jetzt identifizierten SUR2 Splice-Varianten zusammen. Nach Aguilar-Bryan et al. (1998), Chutkow et al. (1999).

Dies ist von Bedeutung, da diese Isoformen in Verbindung mit Kir6.1 sehr unterschiedliche elektrophysiologische und pharmakologische Eigenschaften von

$K_{ATP}$ -Kanälen determinieren. **Abb. 4.3** fasst die wichtigsten Mitglieder der Familie der  $K_{ATP}$ -Kanäle und ihre Charakteristika zusammen.

Typ	Untereinheiten	Leitfähigkeit		hemmende [ATP ( $\mu$ M)]		aktivierende [Pinacidil]
		nativ	recomb	nativ	recomb	
Pankreas Neurone	SUR1/Kir6.2	50-65 pS	69-73 pS	10-20	8-10	hoch $\mu$ M
Herz	SUR2A/Kir6.2	80 pS	79 pS	17-100	100	hoch $\mu$ M
Skelett-Muskel	SUR2A/Kir6.2	74 pS	79 pS	135	100	hoch $\mu$ M
Glatte Muskulatur	SUR2B/Kir6.2	80 pS	80 pS	53		niedrig $\mu$ M
Gefäß-Muskulatur	SUR2B/Kir6.1	18-30 pS	33 pS	Aktivierung		100 $\mu$ M

**Abb. 4.3 – Typen und Eigenschaften von  $K_{ATP}$ -Kanälen.** Den Untereinheiten-Kombinationen sind die Eigenschaften der durch sie gebildeten Kanäle zugeordnet. Leitfähigkeit und hemmende ATP-Konzentration sind jeweils für *in vivo* und für rekombinante (recomb; z.B. Xenopus-Oozyten-Expression) Experimente angegeben. Die Leitfähigkeiten sind für symmetrische  $K^+$ -Lösungen (135-145 mM) angegeben, die native Leitfähigkeit bei SUR2B/Kir6.1 ist ein für diese Bedingungen korrigierter Schätzwert. **Hervorgehoben** ist der  $K_{NDP}$  Kanal aus Kir6.1/SUR2B, welcher durch ATP nicht gehemmt, sondern aktiviert wird. Abbildung adaptiert aus Babenko et al. (1997).

Da in der Ratte und der Maus mehrfach SUR2B-, jedoch nie SUR2A-mRNA nachgewiesen wurde (Beesley et al. 1999, Chutkow et al. 1999, Tanemoto et al. 2000, Szamosfalvi et al. 2002), ist es wahrscheinlich, dass SUR2B auch während der Entwicklung des Sammelrohrpithels die prädominante SUR2 Splice-Isoform darstellt. Zu diesem Schluss kommt auch eine jüngst erschienene Studie an Kaninchen, in der neben SUR2B auch SUR2A aus dem Proximalen Tubulus kloniert wurde, jedoch SUR2B für die überwiegend exprimierte Isoform eingeschätzt wird (Brochiero et al. 2002). Ferner ist nach aktueller Datenlage SUR2A nicht in der Lage, mit Kir6.1 funktionsfähige Kanäle zu bilden (Fujita und Kurachi 2000).

Somit liegen während der Sammelrohr-Ontogenese sehr wahrscheinlich Kir6.1/SUR2B- $K_{ATP}$ -( $K_{NDP}$ )-Kanäle vor (Fujita und Kurachi 2000, Russ et al. 1999, Yamada et al. 1997). Die Pharmakologie der Wachstums-Antwort von Nephron-Kulturen und von HEK293-Zellen auf die  $K^+$ -Kanalmotoren Pinacidil und Glibenclamid spricht ebenfalls für das Vorliegen funktioneller Kir6.1/SUR2B-Kanäle

(siehe unten). Diese Kanäle sind nativ in der Gefäßmuskulatur beschrieben und haben eine Leitfähigkeit von 33 pS (**siehe Abb. 4.3**). Entgegen den allgemeinen namensgebenden Eigenschaften der Kir K<sub>ATP</sub>-Kanäle sind sie nur schwach einwärtsgerichtet, nicht durch ATP hemmbar und benötigen ATP und Diphospho-Nukleoside für ihre Aktivierung (Fujita und Kurachi 2000). Daher wurde für diese K<sub>ATP</sub>-Kanäle die alternative Bezeichnung K<sub>NDP</sub> (*K<sup>+</sup>-nucleotide dependent*) vorgeschlagen (Aguilar-Bryan et al. 1998, Fujita und Kurachi 2000). Kir6.1 kann auch mit CFTR interagieren (Ishida-Takahashi et al. 1998), jedoch ist die physiologische Bedeutung dieser Interaktion unklar. Dies gilt auch für die Frage, ob die Coexpression von Kir6.1 und CFTR (siehe Kap. 3.5.1) in frühen Ureterknospengenerationen von physiologischer Relevanz ist.

Das Vorkommen der verbleibenden Kir6/SUR-Untereinheiten Kir6.2 und SUR1 während der Nephrogenese ist unwahrscheinlich, da beide mRNAs in Ureterknospen-Monolayer Primärkulturen und in adulten Nieren nicht nachweisbar waren (eigene nicht gezeigte Daten; Beesley et al. 1999, Inagaki et al. 1995, Brochiero et al. 2000). Die Rolle der im adulten Sammelrohr wiederauftretenden Expression von SUR2-mRNA bleibt weitgehend unklar, auch wenn in der Literatur die mögliche Interaktion von SUR2B und ROMK2 beschrieben wurde (Tanemoto et al. 2000). Die ebenfalls beschriebene Interaktion zwischen dem epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanal ENaC und SUR (Konstas et al. 2001) könnte hier in einer Suppression der ENaC-Oberflächenexpression resultieren, **Diskussion in Kap. 4.5.1**.

Kir6.1-Protein wurde in der vorliegenden Arbeit im kondensierten Mesenchym und ubiquitär im jungen Nephron während der Entwicklung bis zum Stadium des S-förmigen Körpers nachgewiesen, während die Expression nach der Fusion von Nephron und Ureterknospe stärker begrenzt war (im adulten Stadium auf den Proximalen Tubulus; siehe unten). Auch in UB/Nephron-Kulturen konnte die Expression von Kir6.1-Protein im kondensierten Mesenchym, und eine relative Herunterregulation in späteren Stadien gezeigt werden (Huber et al. 2000). Die Expression von SUR2 während der Nephronentwicklung wurde nicht untersucht, da ein spezifischer Antikörper nicht erhältlich war, und da die Möglichkeiten für eine mRNA-Analyse in diesen Geweben sehr beschränkt ist. Jedoch ist die Co-

Expression von SUR2B mit Kir6.1-Protein im sich entwickelnden Nephron wahrscheinlich, da Proximale Tubuli (PT) im adulten Stadium SUR2B-Protein und -mRNA exprimieren (Beesley et al. 1999, Tanemoto et al. 2000, Brochiero et al. 2002). Darüber hinaus spricht die *Pinacidil*-Antwort der Nephron-Kulturen stark für die Gegenwart von funktionellen  $K_{ATP}$ -Kanälen im sich entwickelnden Nephron-Epithel.

Insgesamt ist somit vom Vorhandensein funktioneller Kir6.1/SUR2B ( $K_{NDP}$ )-Kanäle in frühen Stadien der Sammelrohr- und der Nephronentwicklung und deren anschließender Herunterregulation auszugehen. Die Proliferations-Experimente mit  $K^+$ -Kanalmodulatoren legen eine wachstumsregulierende Rolle dieser frühen Expression nahe (siehe folgendes Kapitel).



## 4.2.2 Funktionelle Bedeutung für die Zellproliferation

In den funktionellen Experimenten dieser Arbeit stimulierte der Kanalöffner Pinacidil in verschiedenen Konzentrationen das Zellwachstum sowohl von *in-vitro*-Nephron-Kulturen als auch von HEK293-Zellen. Nephron-Kulturen wurden mit 100 µM stimuliert, da in der Literatur bei 100-300 µM ein stimulatorischer Effekt von Pinacidil auf Kir6.1/SUR2B-Kanäle gezeigt worden war (Fujita und Kurachi 2000, Malhi et al. 2000, Sheppard und Welsh 1999). Jüngere Daten belegen jedoch, dass Kir6.1/SUR2B-Kanäle schon ab Pinacidil-Konzentrationen von 1 µM aktivieren (Fujita und Kurachi 2000, Satoh et al. 1998), während alle anderen Kir6/SUR-Mitglieder in Bezug auf Pinacidil eine EC50 von 10 bis > 500 µM aufweisen (Fujita und Kurachi 2000). In ähnlicher Weise kann Kir6.1/SUR2B effektiv durch Glibenclamid (3 µM) inhibiert werden (Fujita und Kurachi 2000, Russ et al. 1999, Yamada et al. 1999). Der Proliferationsassay an HEK293-Zellen wurde hier durchgeführt, um vor diesem Hintergrund die Pharmakologie der Wachstumsantwort genauer zu charakterisieren. Sowohl die Wachstums-Stimulation durch die niedrige Konzentration von 1 µM Pinacidil als auch die Inhibition des Wachstums durch Glibenclamid (3 µM) waren signifikant und sprechen für das Vorhandensein von Kir6.1/SUR2B-Kanälen. Die gewählte Glibenclamid-Konzentration von 3 µM war niedrig genug, um Interaktionen mit CFTR als möglichem unspezifischen *Confounder* zu vermeiden (Sheppard und Welsh 1999).

Die vorliegenden Daten zeigen, daß die Aktivierung von Kir-Kanälen die Zell-Proliferations-Rate steigert, so wie dies bereits an einer Reihe von anderen Geweben beschrieben wurde, z.B. an Blut-Stamm- oder Leberzellen (Shirihai et al. 1998, Malhi et al. 2000) und in weiteren Geweben (Cahalan et al. 2001, Koegel und Alzheimer 2001). Auch klinisch werden spezifische Öffner von Kir6/SUR-(K<sub>ATP</sub>)-Kanälen (Pinacidil, Minoxidil und Cromakalim) seit längerem zur Steigerung der Zellproliferation eingesetzt: bei Patienten mit Alopezie, um die Haar-Follikelzell-Proliferation und damit den Haarwuchs zu steigern (Ashcroft und Gribble 2000, Buhl et al. 1993). Während der Zellproliferation können K<sup>+</sup>-Leitfähigkeiten z.B. eine Rolle in der G1 zu S1-Progression, in Signalwegen (z.B. Ca<sup>2+</sup>) oder in der Volumen-

regulation spielen (Lang et al. 1998, Lang et al. 1998a, Wonderlin und Strobl 1997, Rouzaire-Dubois et al. 2000). Die Rolle von  $K_{ATP}$ -Kanälen in der Nieren-Zellproliferation wird auch durch jüngste Daten unterstrichen, die eine Hochregulation von Kir6.1-mRNA in einem Ischämie-Reperfusion-Modell der Niere belegen (Sgard et al. 2000).

Die mRNAs der vermuteten Mediatoren des Pinacidil-Effektes, Kir6.1 und SUR2, fanden sich früh-embryonal, i.e. zum Zeitpunkt der größten Proliferation (Saxén 1987), hoch exprimiert und waren anschließend herunterreguliert. **Eine Mögliche Implikation dieser Tatsache wäre die Vorstellung, dass ontogenetische Programme über die  $K^+$ -Kanal Aktivität das Wachstum regulieren.**

Die Möglichkeit in diesem Kontext mittels pharmakologischer oder biologischer Methoden auf die  $K^+$ -Kanalaktivität Einfluss zu nehmen kann von steigendem Interesse sein, da die Perspektiven der Stammzellforschung und der therapeutischen Organkultur zunehmend vielversprechend werden. Eine vor kurzem veröffentlichte Arbeit über den Effekt von Cromakalim und Tolbutamid auf die Embryonalentwicklung (Smoak 1999), sowie die hier gezeigten Daten sprechen aber auch für ein dysmorphogenes Potential von  $K^+$ -Kanalmodulatoren. Dieses Potential ist zu beachten, da diese Substanzen bereits zur Behandlung verschiedenster Krankheitsbilder klinisch eingesetzt werden (z. B. Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Alopezie; Ashcroft und Gribble 2000, Andersson 1992).

### 4.3 K<sub>ATP</sub>-Kanäle im adulten Proximalen Tubulus

Apikale K<sup>+</sup>-Leitfähigen im Proximalen Tubulus (PT) können entscheidend für den Erhalt eines für die Resorption von Kationen nötigen elektrochemischen Gradienten sein (Giebisch 1995, Giebisch 1998, Giebisch 1999). Die vorliegende Arbeit weist Kir6.1-Protein im adulten PT apikal und schwach basolateral nach. Die Expression von Kir6.1 im PT wurde auch von Anzai et al. (1997) in Abstract-Form berichtet. Da auch SUR2B-Protein im adulten PT apikal und und basolateral exprimiert wird (Beesely et al. 1999), bestehen nun erstmals eindeutige Hinweise auf struktureller Ebene für das Vorhandensein von Kir6.1/SUR2B-(K<sub>NDP</sub>)-Kanälen im PT.

In der apikalen PT-Membran wurden bis heute weitere K<sup>+</sup>-Kanalproteine nachgewiesen, was eine größere Vielfalt der K<sup>+</sup>-Kanal-Expression nahelegt: TASK-1 (Mitglied der neuen Familie der doppel-porigen K<sup>+</sup>-Kanäle; Cluzeaud et al. 1998, Lesage und Lazdunski 2000) und I<sub>sk</sub>/minK (ein Poren-Protein, das mit spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanal Untereinheiten assoziiert; Sugimoto et al. 1990). Auf elektrophysiologischer Ebene liegen nur wenige Informationen über K<sup>+</sup>-Kanäle der apikalen PT-Membran vor, aus denen sich bis jetzt kein spezifischer Nachweis von K<sub>NDP</sub>-Kanälen ergab (Gögelein und Greger 1984, Kawahara 1985). Dies kann an der schweren Zugänglichkeit der Bürstensaum-Membran für Patch-clamp-Experimente (Gögelein und Greger 1984) sowie an den besonderen Voraussetzungen für die Aktivierung von K<sub>NDP</sub>-Kanälen liegen (ATP, Diphospho-Nukleoside, evtl. K<sup>+</sup>-Kanalöffner).

Der schwache basolaterale Protein-Nachweis für SUR2B (Beesley et al. 1999) und Kir6.1 (diese Arbeit) weist auf die Möglichkeit hin, dass K<sub>NDP</sub>-Kanäle auch in der basolateralen PT-Membran exprimiert sein könnten. In der Tat sprechen kürzlich erschienene Patch-clamp Studien dafür, dass Kir6.1/SUR2B-Kanäle eine K<sub>NDP</sub>-Leitfähigkeit in der basolateralen PT-Membran (Noulin et al. 1999, Brochiero et al. 2002, Mauerer et al. 1998) bilden. Alternativ könnte dem basolateralen Kir6.1-Signal auch mitochondriale Expression zugrunde liegen. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass Kir6.1 mitochondrial exprimiert werden kann (Suzuki et al. 1997) sowie aus der

überwiegend basolateralen Lokalisation der Mitochondrien im Proximalen Tubulus (Kaissling und Kriz 1979, Tisher und Madsen 2000).

## 4.4 ROMK K<sup>+</sup>-Kanäle in der Nephrogenese

### 4.4.1 Die frühe Sammelrohr- und Nephron-Genese

Obschon ROMK-mRNA vor allem während der postnatalen Sammelrohr-Reifung exprimiert wird, ist sie bereits in embryonalen UB-Stadien nachweisbar (Daten in Kap. 3.1.1). Auch auf der Protein-Ebene ist ROMK bereits in UB und embryonalen Sammelrohren nachweisbar (in einem Expressionsmuster wie Kir6.1, siehe Kap. 3.1.3). Diese Redundanz der Untereinheiten-Expression könnte ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von Kir-Kanälen während der renalen Ontogenese sein.

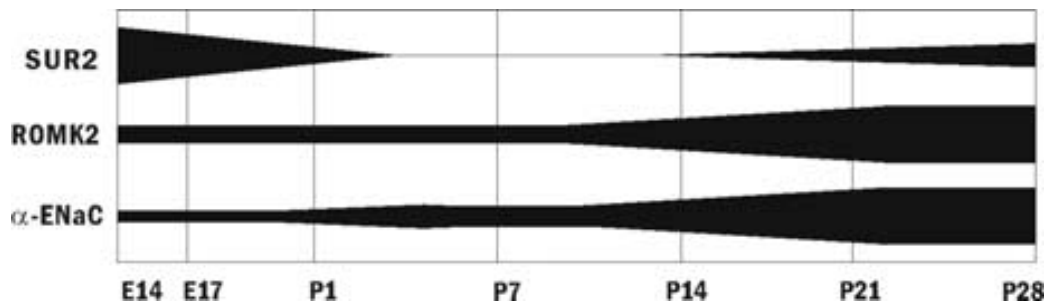
UB-Zellen und Zellen in mesenchymalen Kondensationen verfügen über eine makroskopische K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit sowie über Einzelkanäle, deren Eigenschaften (1/R ~30 pS; gering einwärtsgleichrichtend) sowohl mit ROMK als auch mit Kir6.1/SUR2B als morphologisches Korrelat vereinbar sind (Huber und Horster 1996, Huber et al. 2000). Die Pinacidil-Stimulation von UB/Nephron-Kulturen liefert keine Information über funktionelle ROMK-Kanäle in embryonalen Sammelrohr- oder Nephron-Epithelien, da Pinacidil an ROMK-Kanälen keine Wirkung hat (die Wirkung basiert auf Interaktion mit SUR2, diskutiert in Kap. 4.2.2).

### 4.4.2 Die postnatale Reifung des Sammelrohrepithels

Während der postnatalen Reifung des kortikalen Sammelrohrepithels kam es zu einer deutlichen Zunahme der mRNA-Expression von ROMK2 (Faktor 4 zwischen P7-8 und P21-28; siehe Kap. 3.1.1).

In der adulten Niere ist ROMK2 die am weitesten verbreitete Isoform (TAL, DCT, CNT, CCD), ROMK1 ist auf CCD, und ROMK3 auf TAL beschränkt (Boim et al. 1995). In UB/CCD Stadien konnten ROMK1 und 3 bei ähnlicher Sensitivität wie für ROMK2 nur unregelmässig detektiert werden (Kap. 3.1.1). Die geringe Expression

von ROMK3 ist mit der adulten Distribution gut vereinbar. Die im Vergleich zu ROMK2 schwache ROMK1-mRNA-Expression spricht dafür, dass ROMK2 die primär exprimierte Isoform während der CCD-Reifung darstellt (zusammengefasst in **Abb. 4.4**).



**Abb. 4.4 – Synopsis des zeitlichen Verlaufs der untersuchten SUR2-, ROMK2- und α-ENaC-mRNA Expression in Sammelrohr-Monolayer-Primärkulturen.** Die Expression ist gegen embryonale und postnatale Stadien aufgetragen. Die Dicke der Balken kodiert die Abundanz an mRNA.

Die postnatale Zunahme an ROMK2-mRNA wurde in einer weiteren Arbeit belegt (Benchimol et al. 2000) und deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen postnatalen Zunahme von ROMK-ähnlichen 42-pS K<sup>+</sup>-Kanälen in patch-clamp-Experimenten (Satlin und Palmer 1997). Sie legt nahe, dass diese funktionelle Expressions-Zunahme zumindest teilweise durch die transkriptionelle Heraufregulation von ROMK2 bedingt ist.

Die vorliegenden Daten (Kap. 3.1.1) belegen auch, dass ROMK- und SUR2B-mRNA schon während junger UB-Stadien sowie in spät postnatalen und adulten CCD-Stadien co-exprimiert werden, zusammengefasst in **Abb. 4.4**. Zwar ist die Interaktion von SUR2B- und ROMK-Protein beschrieben worden (Tanemoto et al. 2000), ob eine solche Interaktion physiologische Bedeutung hat, ist jedoch unklar.

Analog zu ROMK2-mRNA wurde auch die mRNA des apikalen Na<sup>+</sup>-Kanals ENaC während der CCD-Reifung heraufreguliert (siehe Kap. 3.1.1) (zusammengefasst in **Abb. 4.4**). Dies spricht dafür, dass auch die beschriebene postnatale Zunahme der

ENaC-Leitfähigkeit (Huber et al. 1999, Satlin und Palmer 1997) zumindest teilweise durch transkriptionelle Heraufregulation im gleichen Zeitfenster erfolgt.

In Bezug auf ihre Morphologie (Expression von extrazellulären Matrixmolekülen, Zell-Zell-Kontakten, etc.) sind CCD-Zellen deutlich **vor** dem Erwerb dieser apikal exprimierten Ionenkanäle apiko-basal polarisiert (Details siehe Kap. 1.2.2 und 4.6). Die funktionelle Spezialisierung der apikalen Membran ist vermutlich der letzte Schritt der Epithelogenese in Sammelrohrepithelien.

### **4.4.3 Die ROMK-mRNA-Expression ist cAMP-abhängig**

#### **4.4.3.1 Implikationen für die Funktion der adulten Niere**

Ein wichtiger Signalweg der adulten Sammelrohr-Hauptzelle geht vom hypophysären Peptid-Hormon Vasopressin (AVP, antidiuretisches Hormon / ADH) aus. AVP bindet an den Vasopressin-Typ-2-Rezeptor (V2R) der Hauptzelle und aktiviert über das *stimulierende* G-Protein (G<sub>s</sub>) das Enzym Adenylatzyklase (AC), welches 3'-5'-zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) synthetisiert (Alberts et al. 1994, Féraille und Doucet 2001, Nonoguchi et al. 1995).

cAMP aktiviert unter anderem die Proteinkinase-A (PKA), welche mittels Phosphorelierung schnell den Einbau von Aquaporinen (AQP-2) in die apikale Membran sowie von Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in die basolaterale Membran vermittelt. Ferner steigert Vasopressin über andere noch nicht vollständig entschlüsselte Signalwege auch die Aktivität und Oberflächenexpression des ENaC-Na<sup>+</sup>-Kanals (teilweise cAMP-abhängig – Féraille und Doucet 2001; teilweise über die Serum-Glucocorticoid-abhängige-Kinase-1 / SGK-1 – Alvarez de la Rosa und Canessa 2003). Synergistisch hierzu bewirkt der AVP-Signalweg langfristig auch eine Steigerung der Transkription der mRNA von AQP-2 (Yasui et al. 1997), β- und

$\gamma$ -ENaC und der  $\alpha$ 1-Untereinheit der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase (Djelidi et al. 1997), was insgesamt eine Aktivierung von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -reabsorptiven Mechanismen bedeutet.

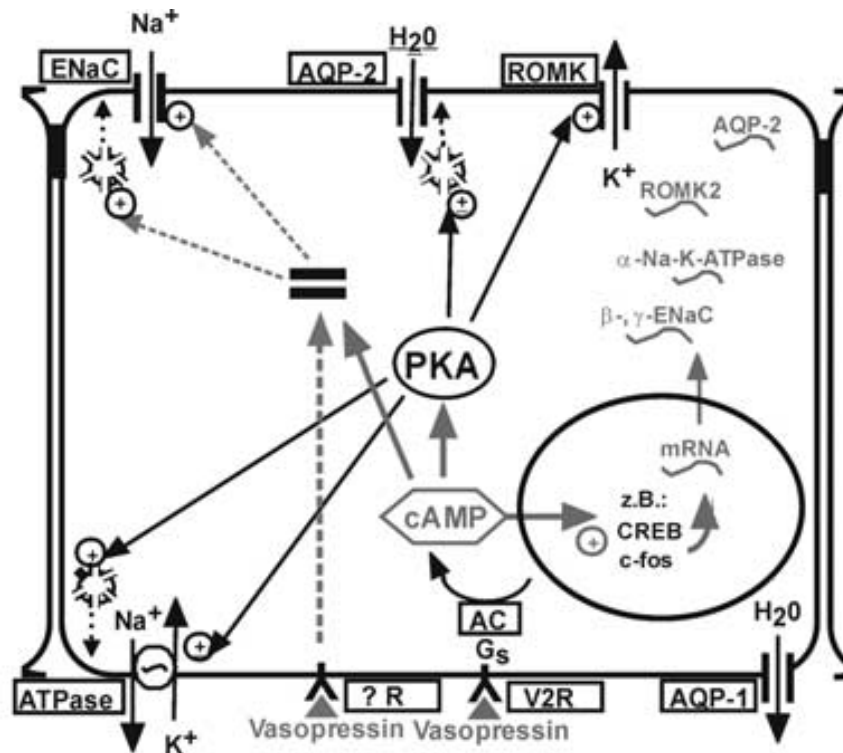
Zusätzlich aktiviert Vasopressin über cAMP und PKA direkt die ROMK-ähnliche  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit (Cassola et al. 1993, Féraille und Doucet 2001, Klussmann et al. 1999). Die in Kap. 3.1.2 gezeigten Daten belegen nun erstmals, dass cAMP ROMK-Kanäle nicht nur funktionell, sondern auch transkriptionell (ROMK2-mRNA) aktiviert.

**Abb. 4.5** fasst die wichtigsten Vasopressin- und cAMP-abhängigen Signalwege der Hauptzelle zusammen.

Es ist wahrscheinlich, dass der in Ureterknospen-Monolayer-Primärkulturen erhobene Befund der transkriptionellen Aktivierung von ROMK2 durch cAMP auch auf die adulte Sammelrohr-Hauptzelle extrapolierbar ist. Auch im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (TAL) wurde jüngst die Vasopressin- und cAMP-abhängige Heraufregulation von ROMK auf Proteinebene beschrieben (Ecelbarger et al. 2001). So könnte einem gesteigerten Bedarf an  $\text{K}^+$ -Sekretion begegnet werden. Ein solcher Bedarf besteht im dehydrierten Organismus, wenn das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und der AVP-Signalweg aktiviert sind, und im Sammelrohr maximale Mengen an Wasser und  $\text{Na}^+$  rückresorbiert werden (Schafer und Troutman 1990), und hierfür apikale  $\text{K}^+$ -Sekretion zum Erhalt des elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten in der apikalen Membran benötigt wird. AVP könnte so neben seiner „Hauptwirkung“ (Einbau von AQP-2) auch langfristig die für den Volumenhaushalt wichtige  $\text{Na}^+$ -Resorption und  $\text{K}^+$ -Sekretion stimulieren.

Die Signalschritte, die zwischen cAMP und der Zunahme der ROMK2-Transkription stehen, wurden in der vorgelegten Arbeit nicht weiter untersucht. Mögliche Kandidaten sind die Proteine *CREB* (cAMP response element binding protein), *CREM* (cAMP response element modulator), *c-fos* und *ATF-1* (activating transcription factor) (Habener et al. 1995, Yasui et al. 1997).





**Abb. 4.5 – Einflüsse von Vasopressin (AVP) auf Transportfunktionen der Sammelrohr-Hauptzelle. Signalwege: (1, rechte Bildhälfte, durchgängige graue Pfeile:) Vasopressin → V2R → G-Protein (Gs) → Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) → ↑ cAMP → Aktivierung der PKA. PKA vermittelt per Phosphorelierung den Einbau von AQP-2- und Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Protein-enthaltenden Vesikeln in die Plasmamembran und aktiviert die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase direkt. PKA aktiviert auch apikale ROMK-Leitfähigkeiten, wobei unklar ist, ob dies durch Zunahme der Aktivität und /oder durch Vesikel-Einbau vermittelt ist. cAMP-abhängige Transkriptionsfaktoren vermitteln die Heraufregulation von AQP-2, β-/γ-ENaC, der α1-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Untereinheit (Literatur siehe Text) und von ROMK2 (Daten aus der vorliegenden Arbeit). mRNA-Moleküle sind grau dargestellt. (2, linke Bildhälfte, unterbrochene graue Pfeile:) Vasopressin vermittelt über eine nicht vollständig bekannte Signalkaskade die Aktivierung und den Vesikeleinbau von ENaC. Dies ist teilweise abhängig von SGK-1 und von cAMP (siehe Text). ENaC wird ferner durch Aldosteron stimuliert (nicht gezeigt).**

#### 4.4.3.2 Implikationen für die Nephrogenese

Die ROMK2-mRNA-Expression steigt im Kortikalen Sammelrohr (CCD) zwischen der zweiten und der vierten postnatalen Woche um den Faktor 4 an (siehe Kap. 3.1.1). Parallel hierzu ist ROMK-Protein schon in Ureterknospen, im embryonalen

Ureter und in frühen Nephron-Anlagen zu detektieren, während es im reifenden Nephron deutlich im aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife (TAL) exprimiert wird (Kap. 3.1.3 und 3.2.2). Es besteht die Möglichkeit, dass die postnatale Heraufregulation von ROMK im CCD und im TAL über den AVP-cAMP-Signalweg vermittelt sein könnte.

Zum Ansprechen eines Signalweges sind Rezeptoren auf den Zielzellen sowie adäquate Mengen des Hormons in Nähe der Zielzellen notwendig. Über die AVP-Konzentrationen, die an den renalen Epithelien während der Ontogenese herrschen, ist nichts bekannt. Jedoch wird AVP in der Plazenta des Menschen degradiert (Mizutani et al. 1995), so dass mütterliches Hormon den Embryo nicht, oder nur in geringen Mengen erreicht. Bedingt dadurch, dass die Plazenta den Salz-Wasserhaushalt des Embryos mitreguliert, sollten embryonale Plasma-Vasopressin-Spiegel im Vergleich zum postnatalen Stadium gering sein. Durch den nach der Geburt einsetzenden hohen Flüssigkeitsbedarf des Säuglings (Mensch und Maus/Ratte; Satlin 1994) ist mit einer deutlichen postnatalen Zunahme des AVP Spiegels zu rechnen.

Da UB- und CCD-Epithelien über alle Stadien (einschließlich adult) gleichmäßig V2R-mRNA exprimieren (Kap. 3.1.2; Ostrowski et al. 1993) könnte eine postnatale Zunahme an Peptidhormon den postnatalen ROMK2-mRNA-Anstieg in UB/CCD zumindest teilweise vermitteln. Auch der postnatale Erwerb von ROMK-Protein im TAL könnte zumindest teilweise durch AVP vermittelt sein, da TAL während der Entwicklung V2R exprimiert (Ostrowski et al. 1993). Allerdings bleiben solche Überlegungen spekulativ, da unter anderem auch eine Reihe von Gegenspielern des AVP-cAMP-Signalweges in renalen Epithelien exprimiert wird, deren Aktivität während der Ontogenese unklar ist (Férraille und Doucet 2001).

## 4.5 Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Kanäle in der Nephrogenese

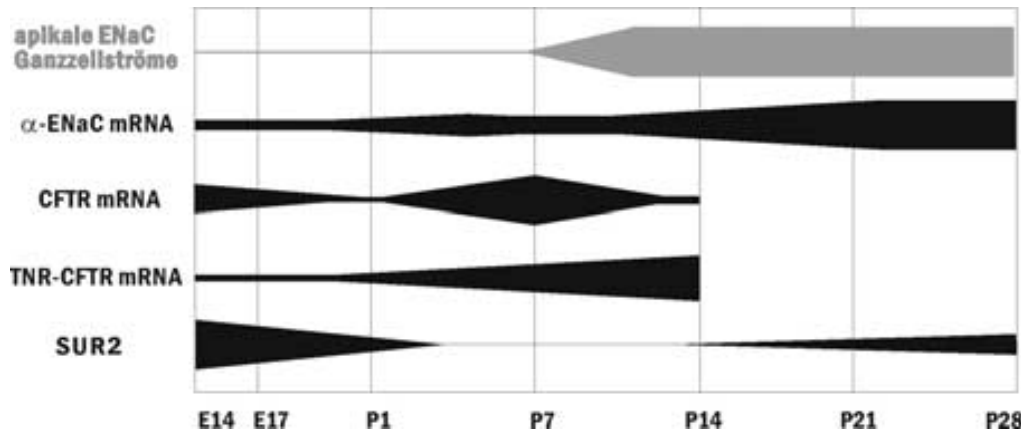
Die oben diskutierten Daten der K<sup>+</sup>-Kanal-Expression und -Funktion weisen auf eine Bedeutung von K<sup>+</sup>-Leitfähigkeiten für die Proliferation in frühen Sammelrohr- und Nephronstadien hin. Ferner wurde der molekulare Erwerb eines adulten K<sup>+</sup>-Kanals (ROMK) mit zunehmender Entwicklung gezeigt.

Im zweiten Teil der vorgelegten Arbeit wurde die Expression von Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Kanal-mRNA während der Sammelrohr-Ontogenese untersucht. Das Sammelrohrepithel ist die am besten charakterisierte Struktur der Nephrogenese (Stuart und Nigam 2000). Ziel war es, bereits bekannte elektrophysiologische Daten mit der Ionenkanal-mRNA-Expression zu korrelieren. Die daraus resultierenden zeitlichen Expressionsverläufe geben Informationen über die NaCl-Transportfunktionen in den jeweiligen Entwicklungsabschnitten.

### 4.5.1 $\alpha$ -ENaC-mRNA im Sammelrohrepithel

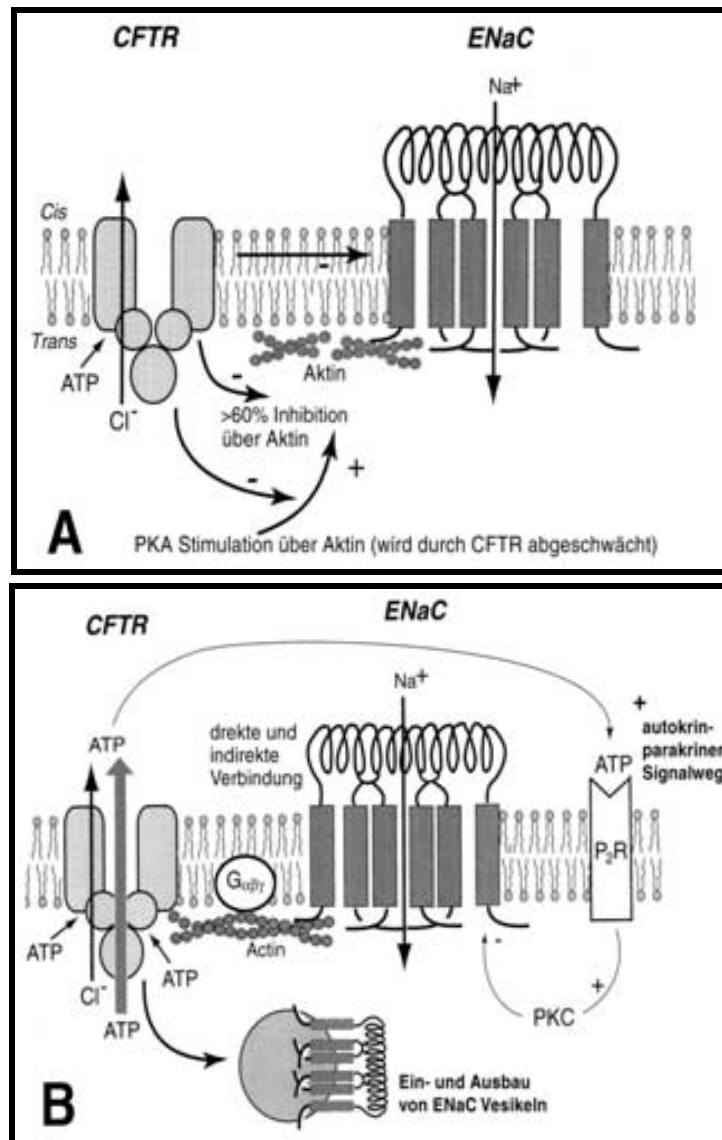
Der Erwerb der Na<sup>+</sup>-Reabsorption ist kritisch für das Überleben nach der Geburt. Apikale Na<sup>+</sup>-Leitfähigkeiten werden mit der postnatalen Entwicklung des CCD zunehmend erworben (Huber et al. 1999, Satlin 1994, Satlin und Palmer 1997). In Sammelrohrepithel-Primärkulturen zeigen Ureterknospen-Epithelien bis einschließlich Stadium P6 vereinzelt *Amilorid*-sensitive ENaC-Na<sup>+</sup>-Kanäle, jedoch keine makroskopischen Na<sup>+</sup>-Ströme (Huber et al. 1999). In CCD-Epithelien der Stadien P9-P14 hingegen, existieren deutliche amiloridsensitive Na<sup>+</sup>-Ganzzell-Ströme (Huber et al. 1999) (zusammengefasst in **Abb. 4.6**). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass mit diesen Ereignissen die Heraufregulation von ENaC-mRNA parallel läuft (siehe Kap. 3.4.1). Gleiches gilt für die ENaC-Protein-Expression (Zolotnitskaya und Satlin 1999).  $\alpha$ -ENaC-Untereinheiten können bereits alleine funktionelle Kanäle bilden, deren volle Aktivität jedoch erst durch Co-Expression der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten erreicht wird (Alvarez de la Rosa et al. 2000). Im Rahmen von präliminären Experimenten für die vorliegende Arbeit wurden  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC

mRNAs in UB/CCD Kulturen in ähnlichen Mengen und Zeitverläufen detektiert wie  $\alpha$ -ENaC mRNA (nicht gezeigt).



**Abb. 4.6 – Synopsis des zeitlichen Verlaufs der Expression von makroskopischen apikalen ENaC-Strömen und  $\alpha$ -ENaC-, SUR2- und CFTR-mRNA in Sammelrohr-Monolayer-Primärkulturen.** Die Balkendicke kodiert die makroskopischen ENaC-Stromstärken im Vergleich zur Gesamtleitfähigkeit der apikalen Membran, bzw. die Abundanz an mRNA.

ENaC-mRNA wurde jedoch auch schon in UB-Stadien und somit **vor** auftreten makroskopischer  $\text{Na}^+$ -Ströme detektiert (siehe Kap. 3.4.1). Es ist denkbar, dass in diesem Stadium vorhandenes ENaC-Protein funktionell durch co-exprimierten *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR, eingeführt in Kap. 1.3.3) supprimiert wird (die negative Interaktion von Wildtyp-CFTR mit ENaC ist seit langem bekannt; Schwiebert et al. 1999). Wildtyp-CFTR könnte während der gesamten Ureterknospenphase des Sammelrohrepithels, wo es (zweigipfelig) auf mRNA-Ebene hoch exprimiert wird, ENaC funktionell supprimieren. Eine solche ENaC-CFTR-Interaktion ist wahrscheinlich während der Ontogenese des Bronchialepithels realisiert (Murray et al. 1995, Souza et al. 1995): in der Frühphase der Entwicklung wird luminal  $\text{Cl}^-$  und  $\text{H}_2\text{O}$  sezerniert (CLC-2-vermittelt), während in der Zellmembran bereits vorhandene ENaC-Kanäle durch CFTR-bedingte Hemmung stumm bleiben. Nach der Geburt wird von dieser für die Größenentwicklung des Bronchialbaumes entscheidenden (Alcorn et al. 1977, Alcorn et al. 1980) Sekretion auf ENaC-vermittelte  $\text{Na}^+$ - und  $\text{H}_2\text{O}$ -Resorption umgeschaltet (Murray et al. 1995, Souza et al. 1995). Die Interaktion von ENaC und CFTR ist schematisch in **Abb. 4.7** zusammengefasst.



**Abb. 4.7 – Modell der bewiesenen und hypothetischen negativen Modulationswege von ENaC durch CFTR.** **A:** (1) ENaC-Kanäle werden u.a. durch Proteinkinase-A (PKA) aktiviert (Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit  $P_o$  und der mittleren Offenzeit  $MOT$ ). CFTR schwächt diese Aktivierung aktinvermittelt deutlich ab (Daten aus Lipid-Doppelschichten). **B:** (2) Neben der aktinvermittelten Herunterregulation der ENaC-Aktivität könnten auch direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen ENaC und CFTR bestehen (Daten aus Two-Hybrid-System-Experimenten). (3) Eine dritte, **noch hypothetische** Möglichkeit der ENaC-Suppression ist parakrine ATP-Sekretion durch CFTR. In Folge würden P2Y2-Rezeptoren aktiviert und ENaC mittels Phospholipase C (PLC)—Proteinkinase C (PKC)-Aktivierung inhibiert. In der Tat exprimieren Ureterknospen und Sammelrohrepithelien P2Y2-mRNA (Tschöp et al. 2002). (4) Extrazelluläres ADP könnte über Adenosin-A1-Rezeptoren und inhibitorisches G-Protein ( $G_i$ ) den cAMP-Spiegel senken die PKA-Aktivität reduzieren. (5) CFTR könnte auch den Membran-Einbau von ENaC regulieren. Adaptiert aus Schwiebert et al. (1999).

Auch für den Sulfonylharnstoff-Rezeptor wurde kürzlich eine ENaC-supprimierende Interaktion beschrieben (Konstas et al. 2002). Folglich könnte nun auch die hohe SUR2-Expression in jungen Ureterknospen für die Abwesenheit von ENaC-Strömen verantwortlich sein (**Abb. 4.6**). Im adulten Sammelrohr könnte vorhandenes SUR2 eine Rolle in der ENaC-Regulation spielen.

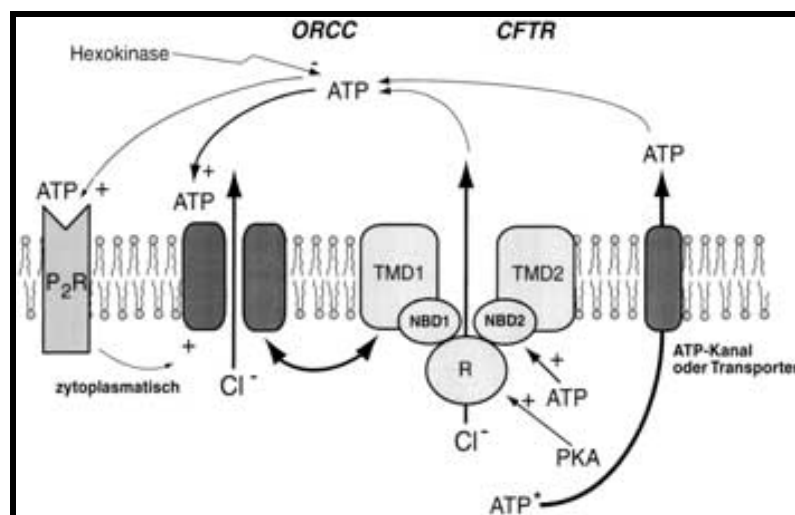
## 4.5.2 CFTR-mRNA im Sammelrohrepithel

Die vorliegenden Daten (Kap. 3.5.1) zeigen, dass Ureterknospen und Sammelrohrepithelien mRNA für den *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR; eingeführt in Kap. 1.3.3) exprimieren.

Neben Wildtyp-CFTR (WT-CFTR)-mRNA konnte eine Splicevariante von CFTR-mRNA detektiert werden, bei der eine Leserasterverschiebung bei der Translation zu einem durch vorzeitigen Strangabbruch verkürzten Protein führt: Dieses Protein besteht aus der ersten Transmembrandomäne, dem ersten Nukleotid-bindenden Element (NBF 1) und aus 93 % des Regulator Elements (siehe Kap. 1.3.3; Sheppard und Welsh 1999) und heisst deshalb akronym **TNR-CFTR**. Wie WT-CFTR bildet TNR-CFTR eine Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeit und aktiviert ORCC (*outwardly rectifying chloride channels*) Cl<sup>-</sup>-Kanäle (siehe unten). Es jedoch im Unterschied zu WT-CFTR überwiegend intrazellulär lokalisiert und nur zu ~25 % an der Plasmamembran exprimiert (Devuyst et al. 1996, Morales et al. 1995).

**Abb. 4.6** fasst die Expression der CFTR-mRNAs während der Sammelrohrontogenese zusammen: WT-CFTR wird (zweigipfelig) embryonal exprimiert und dann herunterreguliert. In Einklang mit dieser Herunterregulation steht die relativ niedrige CFTR-mRNA-Expression in adulten Sammelrohr-Hauptzellen (relative Expression in Hauptzellen : A-Schaltzellen : B-Schaltzellen = 1 : 4,5 : 25; Todd-Turla et al. 1996). Während der UB-Entwicklung könnte die hohe WT-CFTR Expression (die auch auf Protein-Ebene bestätigt wurde; Devuyst et al. 1996) neben ENaC-Kanälen (Diskussion siehe oben in Kap. 4.5.1) auch Cl<sup>-</sup>-Kanäle modulieren: CFTR

aktiviert spannungsabhängige Cl<sup>-</sup>-Kanäle vom Typ ORCC (**skizziert in Abb. 4.8**). Interessanterweise exprimieren E17 UB-Zellen ORCC-ähnliche Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeiten, die in den postnatalen UB- und CCD-Stadien nicht mehr nachweisbar sind (Huber und Horster 1996, Huber und Horster 1998). CFTR käme damit neben der pränatalen Suppression der Na<sup>+</sup>-Reabsorption auch eine Funktion der Aktivierung von embryonalen und pränatalen ORCC-Leitfähigkeiten zu. Somit hätte CFTR die Rolle eines Schalters inne, der durch seine Herunterregulation von Cl<sup>-</sup>-Sekretion auf Na<sup>+</sup>-Resorption umstellt.



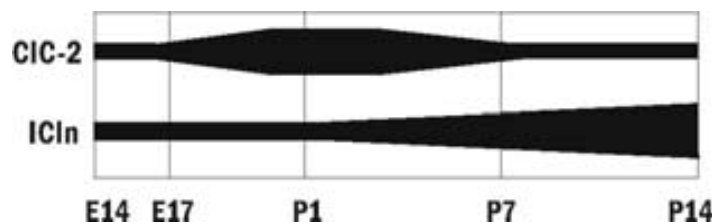
**Abb. 4.8 – Modell der verschiedenen bewiesenen und hypothetischen Aktivierungswege von ORCC Cl-Kanälen durch CFTR.** CFTR wird cAMP-abhängig über die Proteinkinase-A (PKA) und direkt durch ATP aktiviert. CFTR- und ORCC-Proteine interagieren direkt miteinander. Es wird vermutet, dass CFTR-vermittelter ATP-Export ORCC-Kanäle aktiviert. Extrazelluläres ATP kann ORCC-Kanäle direkt oder indirekt über purinerge P<sub>2</sub>-Rezeptoren aktivieren. Sammelrohrethelien exprimieren purinerge Rezeptoren, die dies vermitteln könnten (Tschöp et al. 2002). Adaptiert aus Schwiebert et al. (1999).

Die Bedeutung der zunehmenden TNR-CFTR Expression während der Sammelrohr Ontogenese ist unklar. Adult wird TNR-CFTR vor allem in Medullären, aber kaum in Kortikalen Sammelrohren detektiert (Morales et al. 1996). Dies könnte bedeuten, dass das in der vorliegenden Studie untersuchte junge Sammelrohrethel einige Merkmale des adulten **Medullären** Sammelrohrethels aufweist.

### 4.5.3 CLC-2- und ICLn-mRNA im Sammelrohrepithel

UB-Zellen verfügen neben einer apolaren  $K^+$ -Leitfähigkeit über hohe fraktionelle  $Cl^-$ -Leitfähigkeiten (Huber und Horster 1996, Huber und Horster 1998). Neben ORCC-ähnlichen  $Cl^-$ -Leitfähigkeiten in E17, die durch CFTR aktiviert werden können (siehe Diskussion oben in Kap. 4.5.2), sind in UB-Epithelien auch volumenregulatorische  $Cl^-$ -Leitfähigkeiten beschrieben: diese haben CLC-2- und ICLn-ähnliche Charakteristika (Huber und Horster 1996, Huber und Horster 1998). CLC-2- und ICLn wurden in Kap. 1.3.3 eingeführt.

CLC-2- und ICLn-mRNAs werden in UB exprimiert, wobei CLC-2 in CCD herunterreguliert wird (kein Nachweis im adulten CCD; Obermüller et al. 1998), während ICLn mit zunehmender Entwicklung heraufreguliert wird (Daten aus der vorliegenden Arbeit; Laich et al. 1997) (**Abb. 4.9**).



**Abb. 4.9 – Synopsis des zeitlichen Verlaufs der untersuchten CLC-2- und ICLn-mRNA-Expression in Sammelrohr-Monolayer-Primärkulturen.** Die Expression ist gegen embryonale und postnatale Stadien aufgetragen. Die Dicke der Balken kodiert die Abundanz an mRNA.

In Einklang mit diesen mRNA-Befunden sind CLC-2-ähnliche Kanäle in frühen Stadien der Sammelrohrentwicklung (E17-P6) und ICLn-ähnliche Leitfähigkeiten in späteren Stadien (P1-P14) detektiert worden (Huber und Horster 1996, Huber und Horster 1998).

Zusammengefasst verfügen Sammelrohrepithelien während der gesamten Entwicklung und im adulten Stadium über volumenregulatorische  $Cl^-$ -Leitfähigkeiten, die zumindest zu einem Teil durch CLC-2 und ICLn hervorgerufen werden. Volumenregulation ist essentiell für schnell proliferierende Zellen (wie z.B. die



Ureterknospe), und für Zellen, die vektoriellen Ionen- und Wasser-Transport betreiben (adulte CCD Zellen) (Lang et al. 1998, Lang et al. 1998a).

Der Untersuchung der CLC-2 mRNA Expression in der Sammelrohr-Ontogenese kommt besonderes Gewicht zu: während der dichotomen Verzweigungsmorphogenese des Bronchialepithels, die ähnlich der Sammelrohr-Morphogenese verläuft, werden Cl<sup>-</sup>-Leitfähigkeiten initial hoch exprimiert und führen zu einer luminalen Flüssigkeitssekretion, die für die regelhafte Größen-Entwicklung des Bronchialbaums notwendig ist (Alcorn et al. 1977, Alcorn et al. 1980, Murray et al. 1995, Souza et al. 1995). Ureterknospen selbst scheinen jedoch noch nicht ausreichend polarisiert zu sein, um einen solchen Transport realisieren zu können, diskutiert in Kap. 4.6.

## 4.6 Zelluläre Polarisierung und Differenzierung in der Nephrogenese

Die Vorläufer- und Frühstadien der renalen Epithelien sind nur unvollständig differenziert und apiko-basolateral polarisiert. Wie in Kap. 1.2.2 besprochen, ist der Erwerb des adulten Differenzierungstyps eine der Aufgaben, die Sammelrohr- und Nephronepithelien während der Entwicklung zu bewerkstelligen haben.

Das Ureterknospen- und Sammelrohrepithel stellt die früheste Epithelform während der Metanephrogenese dar. Die sich dichotom verzweigenden Ureterknospen sind eine Leitstruktur, in deren Abhängigkeit sich die Nephrone entwickeln, und deren regelrechte Entwicklung auch Einfluss auf die Größe der adulten Niere haben könnte (vgl. Einfluss der Entwicklung des Bronchialbaumes auf die Größe der Lunge: Alcorn et al. 1977, Alcorn et al. 1980, Souza et al. 1995).

Aus diesen Gründen sowie wegen der relativen Einfachheit der Struktur eignet sich die Entwicklung des Sammelrohrsystems besonders gut als Modell der epithelialen Differenzierungsprozesse der Niere. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bereits bekannt, dass Ureterknospen in Bezug auf die Expression von anatomisch-strukturellen Marker-Molekülen (extrazelluläre Matrixproteine, Zell-Adhäsionsmoleküle, Zytoskelett-Ankerproteine) apiko-basolateral polarisiert sind (siehe Kap. 1.2.1 und Ekblom 1989). Ganz im Gegensatz hierzu sind jedoch elektrische Membranleitfähigkeit und die Expression der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  apolar (Huber und Horster 1996, Minuth et al. 1997, Burrow et al. 1999).

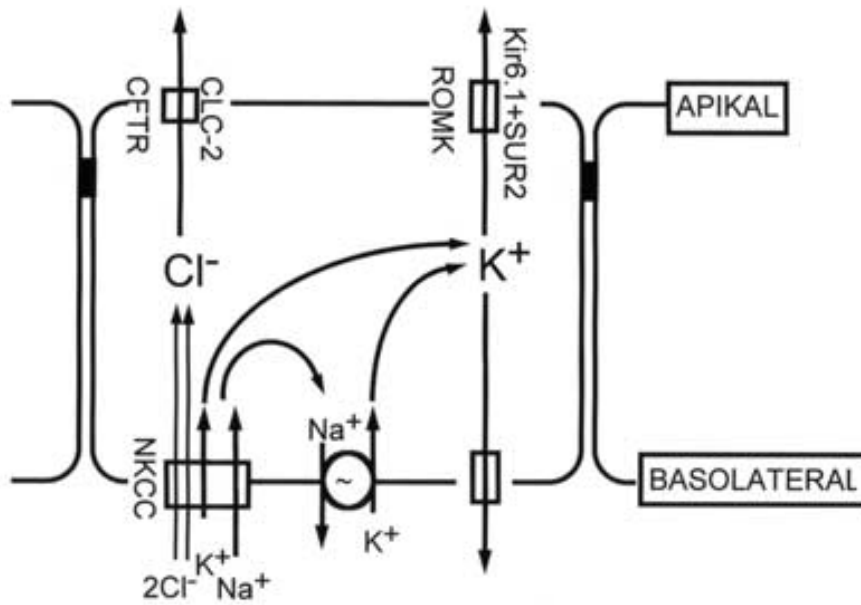
In der vorliegenden Arbeit wurde in Ureterknospen, jungen Sammelrohrepithelien und E15-Uretern eine apolare Verteilung der Ionenkanalproteine Kir6.1 und ROMK nachgewiesen (siehe Kap. 3.1.3). Dies zeigt erneut, dass diese jungen renalen Epithelien in Bezug auf ihre elektrischen Membran-Eigenschaften apolar sind. Auch die Expression von Aquaporin-Subtypen in Ureterknospen ist apolar (Baum et al. 1998).

Die Hypothese, dass tubuläre Sekretion, ähnlich wie in der Ontogenese des Bronchialsystems, durch Offenhalten von Lumina eine morphogenetische Funktion hat, setzt vektoriellen Ionen- und Wassertransport voraus. Alle bis jetzt vorliegenden Daten sprechen gegen eine für vektoriellen Transport ausreichende apiko-basolaterale Differenzierung von Ureterknospen und jungen Sammelrohrepithelien.

Im Ureter des Stadiums E17 hingegen, legt die apikale Dominanz der  $K^+$ -Kanal-Expression (siehe Kap. 3.1.3) die deutliche apiko-basolaterale Polarisierung der Membranleitfähigkeiten nahe. Somit könnte hier die strukturelle Grundlage für vektoriellen Transport gegeben sein. Es werden weitere Untersuchungen über die Transporter- und Ionenkanalfunktion und Expression im embryonalen Ureter notwendig sein, um die eventuelle Existenz morphogenetisch relevanter luminaler Sekretion zu verifizieren.

**Abb. 4.10** zeigt ein – derzeit rein hypothetisches – Modell einer solchen Sekretion. Diese könnte durch einen basolateralen  $Na^+K^+2Cl^-$ -Cotransporter (NKCC/BSC; Übersichts-artikel: Haas und Forbush-III 2001) und apikale  $Cl^-$ - und  $K^+$ -Kanäle vermittelt sein. Interessanterweise konnte das Vorhandensein eines solchen sekretorischen Systems kürzlich in einer Sammelrohrzelllinie nachgewiesen werden (Djelidi et al. 1999). Ein solches Sekretionssystem entspricht im Grunde auch dem vermuteten Aufbau der luminalen netto- $Cl^-$ -Sekretion während der Ontogenese des Bronchialepithels (Murray et al. 1995, Souza et al. 1995). Ferner ist eine essentielle Rolle von NKCC für die Proliferation von Endothelzellen beschrieben (Panet et al. 1994).

Im Nephron sind der absteigende Schenkel des *S-förmigen Körpers* und der primordiale Proximale Tubulus die ersten Strukturen, die eine Polarisierung der Ionenkanal-Protein Expression zeigen. Dort ist Kir6.1-Protein streng apikal exprimiert (siehe Kap. 3.2.1). Auch hier könnten vektorielle Transportfunktionen zur Lumenbildung stattfinden. Weitere Studien sind erforderlich.



**Abb. 4.10 – Hypothetisches Sekretionsmodell in apiko-basal polarisierten Abschnitten des embryonalen Ureters.** Das Modell kombiniert die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ionenkanal-Expressions-Daten mit der noch unbewiesenen Hypothese, dass das embryonale Ureterepithel basolateral den  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC) exprimiert. Apikale und basolaterale  $\text{H}_2\text{O}$ -Kanäle (Aquaporine) die eine transepitheliale Flüssigkeitssekretion ermöglichen sind nicht eingezeichnet.

## 4.7 Ausblick

Seit langem ist die Nephrogenese Gegenstand entwicklungsbiologischer Untersuchungen. Wichtige Transkriptionsfaktoren, Signalwege und Tumor-Suppressoren wurden in der Niere charakterisiert und haben das Verständnis von der Organentwicklung, -fehlentwicklung und Onkogenese gleichermaßen erweitert (Stuart und Nigam 2000, Saxén 1987).

Parallel zu diesen rein zellbiologischen oder molekulargenetischen Studien sind zunehmend auch Arbeiten über die ontogenetische Physiologie renaler Zellen erschienen (Übersicht: Horster 2000, Stuart und Nigam 2000). Sie geben z.B. Aufschluss darüber, in welcher Phase adulte Transporte erworben werden, was als Grundlage für spätere pädiatrische Therapieansätze oder organischen Nierenersatz dienen kann. Andererseits bilden Studien über die ontogenetische Physiologie renaler Zellen auch einen Informationsschatz über die Markermoleküle bestimmter renaler Entwicklungsstadien und Zelltypen, der für spätere Arbeiten relevant sein kann. Es ist zu erwarten, dass die Erkenntnisse über Proliferations-steuernde und morphogenetische Funktionen von Ionenkanälen und Membrantransportern während der Nephrogenese zunehmen werden. So wurde z.B. kürzlich gezeigt, dass im Proximalen Tubulus der Na<sup>+</sup>-Glukose-Austauscher (SGLT) kritisch für die Tubulogenese ist (Yang et al. 2000). Zukünftige Studien könnten die Hypothese der vektorialen Flüssigkeitssekretion und ihrer Modulatoren im embryonalen Ureter untersuchen und die genaue Funktion von Kir6.1/SUR2B-Kanälen in der Zell-Proliferation mittels Antisense- und Transfektions-Experimenten verifizieren.

Einer kürzlich erschienen Arbeit zufolge, kommt es nach Ischämie des Proximalen Tubulus zu einer starken Heraufregulation von Kir6.1-mRNA in der Reperfusionsphase, der sich die zelluläre Regeneration und Proliferation anschließt (Sgard et al. 2000). Die Rolle von Kir6.1/SUR2B-Kanälen bei solchen und anderen pathologischen Vorgängen in der Niere könnte in Zukunft durch weitere Experimente untersucht werden, z.B. in Tiermodellen der Glomerulonephritis. Ionenkanal-Modulatoren könnten hier in Zukunft therapeutische Ansätze zur Beeinflussung des Krankheitsverlaufs oder zur Reduktion der Nephrotoxizität von Substanzen bieten.

Es sind Modelle der extrakorporalen Nierenentwicklung beschrieben worden (Huber et al. 2000, Stuart und Nigam 2000, Saxén 1987). Diese wurden primär zur Erforschung nephrogenetischer Mechanismen herangezogen. Denkbar scheint aber auch der Versuch, für die therapeutische Anwendung im niereninsuffizienten Patienten gezielt heterologes Nierengewebe *in vitro* zu züchten und nach Transplantation *in vivo* zur Ausreifung bringen zu lassen (Hammerman 2003). Das junge Gebiet der (adulten) Stammzellforschung zeigt erste Ergebnisse (Hescheler und Fleischmann 2001, Jiang et al. 2002), so dass in Zukunft möglicherweise auch humanes Stammzellgewebe für solche Zwecke zu Verfügung stehen könnte.

Zum Gelingen solcher organischer Nierenersatz-Strategien können Erkenntnisse über die Nephrogenese sowie ihre Physiologie und über proliferationssteigernde Bedingungen für Zell- und Organkulturen entscheidend beitragen (Schuldiner et al. 2000).

## Kapitel 5 Literatur

1. Abraham, M.R., A. Jahangir, A. E. Alekseev, A. Terzic. Channelopathies of inwardly rectifying potassium channels. *FASEB J.* 13: 1901-1910, 1999
2. Aguilar-Bryan, L., J. P. Clement IV, G. Gonzalez, K. Kunjilwar, A. Babenko, J. Bryan. Toward understanding the assembly and structure of  $K_{ATP}$  channels. *Physiol. Rev.* 78: 227-245, 1998
3. Aigner, J., S. Kloth, M. Kubitza, M. Kashgarian, R. Dermietzel, W. W. Minuth. Maturation of renal collecting duct cells in vivo and under perfusion culture. *Epithelial Cell Biol.* 3: 70-78, 1994
4. Alberts et al., Chapter 15. Cell signaling. In: *Molecular Biology of the Cell*, edited by B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson. New York, N.Y., USA: Garland Publishing Inc., 1994
5. Alvarez de la Rosa, D., C. M. Canessa, G. K. Fyfe, P. Zhang. Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 62: 573-594, 2000
6. Alvarez De La Rosa, D. und C. M. Canessa. Role of SGK in hormonal regulation of epithelial sodium channel in A6 cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 284: C404-C414, 2003
7. Andersson, K. E. Clinical pharmacology of potassium channel openers. *Pharmacol. Toxicol.* 70: 244-254, 1992
8. Anzai, N., I. Izumida, N. Inagaki, S. Seino, K. Kawahara. Expression of  $uK_{ATP}-1$  (Kir6.1) in neonatal rat kidney proximal tubule. *Jpn. J. Physiol.* 47, Suppl. 1: S10-S11, 1997
9. Ashcroft, F. M. und F. M. Gribble. New windows on the mechanism of action of  $K_{ATP}$  channel openers. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 439-445, 2000
10. Babenko, A. P., L. Aguilar-Bryan, J. Bryan. A view of SUR/Kir6.x  $K_{ATP}$  channels. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 667-687, 1998
11. Barisoni, L., M. Trudel, N. Chretien, L. Ward, J. van-Adelsberg, V. D'Agati. Analysis of the role of membrane polarity in polycystic kidney disease of transgenic SBM mice. *Am. J. Pathol.* 147: 1728-1735, 1995

12. Barry, R., P. L. St. John, D. R. Abrahamson. Direct visualization of renal vascular morphogenesis in Flk1 heterozygous mutant mice. *Am. J. Physiol.* 275: F164-F172, 1998
13. Baum, M. A., M. K. Ruddy, C. A. Hosselet, H. W. Harris. The perinatal expression of aquaporin-2 and aquaporin-3 in developing kidney. *Pediatr. Res.* 43: 783-790, 1998
14. Beesley, A. H., I. Z. Qureshi, A. N. Giesberts, A. J. Parker, S. J. White. Expression of sulphonylurea receptor protein in mouse kidney. *Pflugers Arch.* 438: 1-7, 1999
15. Benchimol, C., B. Zvilowitz, L. M. Satlin. Developmental expression of ROMK mRNA in rabbit cortical collecting duct. *Pediatr. Res.* 47: 46-52, 2000
16. Boim, M. A., K. Ho, M. E. Shuck, M. J. Bienkowski, J. H. Block, J. L. Slightom, Y. Yang, B. M. Brenner, S. C. Hebert. ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am. J. Physiol.* 268: F1132-F1140, 1995
17. Breuer, W., N. Kartner, J. R. Riordan, Z. I. Cabantchik. Induction of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductor regulator. *J. Biol. Chem.* 267: 10465-10469, 1992
18. Brill, S.R., K. E. Ross, C. J. Davidow, M. Ye, J. J. Grantham, M. J. Caplan. Immunolocalization of ion transport proteins in human autosomal dominant polycystic kidney epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 10206-10211, 1996
19. Brochiero, E., B. Wallendorf, D. Gagnon, R. Laprade, J. Y. Lapointe. Cloning of rabbit Kir6.1, SUR2A, and SUR2B: possible candidates for a renal K(ATP) channel. *Am. J. Physiol.* 282: F289-300, 2002
20. Buhl, A. E., S. J. Conrad, D. J. Waldon, M. N. Brunden. Potassium channel conductance as a control mechanism in hair follicles. *J. Invest. Dermatol.* 101: 148S-152S, 1993
21. Burrow, C. R., O. Devuyst, X. Li, L. Gatti, P. D. Wilson. Expression of the  $\beta$ 2-subunit and apical localization of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in metanephric kidney. *Am. J. Physiol.* 277: F301-F403, 1999
22. Cahalan, M. D., H. Wulff, K. G. Chandy. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J. Clin. Immunol.* 21: 235-252, 2001
23. Cassola, A. C., G. Giebisch, W. Wang. Vasopressin increases density of apical low-conductance K<sup>+</sup> channels in rat CCD. *Am. J. Physiol.* 264: F502-F509, 1993
24. Chomczynski, P. und N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidin thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* 162: 156-159, 1987



25. Chutkow, W. A., J. C. Makielski, D. J. Nelson, C. F. Burant, Z. Fan. Alternative splicing of sur2 exon 17 regulates nucleotide sensitivity of the ATP-sensitive potassium channel. *J. Biol. Chem.* 274: 13656-13665, 1999
26. Cluzeaud, F., R. Reyes, B. Escoubet, M. Fay, M. Lazdunski, J. P. Bonvalet, F. Lesage, N. Farman. Expression of TWIK-1, a novel weakly inward rectifying potassium channel in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 275: C1602-1609, 1998
27. Dean M., A. Rzhetsky, R. Allikmets. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 117: 1156-1166, 2001
28. Dehbi, M. und J. Pelletier. Pax-8-mediated activation of the WT-1 tumor suppressor gene. *EMBO* 15: 4297-4306, 1996
29. Derst, C., J. R. Hirsch, R. Preisig-Muller, E. Wischmeyer, A. Karschin, F. Doring, A. Thomzig, R. W. Veh, E. Schlatter, W. Kummer, J. Daut. Cellular localization of the potassium channel Kir7.1 in guinea pig and human kidney. *Kidney Int.* 59: 2197-2205, 2001
30. Devuyst, O., C. E. Burrow, E. M. Schwiebert, W. B. Guggino, P. D. Wilson. Developmental regulation of CFTR expression during human nephrogenesis. *Am. J. Physiol.* 271: F723-F735, 1996
31. Devuyst, O., C. R. Burrow, B. L. Smith, P. Agre, M. A. Knepper, P. D. Wilson. Expression of aquaporins-1 and -2 during nephrogenesis and in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Physiol.* 271: F169-183, 1996a
32. Djelidi, S., M. Fay, F. Cluzeaud, B. Escoubet, E. Eugene, C. Capurro, J-P. Bonvalet, N. Farman, M. Blot-Chabaud. Transcriptional regulation of sodium transport by vasopressin in renal cells. *J. Biol. Chem.* 272: 32919-32924, 1997
33. Djelidi, S., M. Fay, F. Cluzeaud, A. Thomas-Soumarmon, J. P. Bonvalet, N. Farman, M. Blot-Chabaud. Vasopressin stimulates long-term net chloride secretion in cortical collecting duct cell. *FEBS Lett.* 460: 533-538, 1999
34. Dørup, J. und A. B. Maunsbach. The ultrastructural development of distal nephron segments in the human fetal kidney. *Anat. Embryol.* 164: 19-41, 1982
35. Ecelbarger, C. A., Kim, G. H., Knepper, M. A., Liu, J., Tate, M., Welling, P. A., Wade, J. B. Regulation of potassium channel Kir1.1 (ROMK) abundance in the thick ascending limb of Henle's loop. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 10-8, 2001
36. Evan, A. P., L. M. Satlin, V. H. Gattone, B. Connors, G. J. Schwartz. Postnatal maturation of rabbit renal collecting duct. II. Morphological observations. *Am. J. Physiol.* 261: F91-F107, 1991

37. Féraille, E. und A. Doucet. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol. Reviews* 81: 345-418, 2001
38. Firsov, D., I. Gautschi, A.-M. Merillat, B. C. Rossier, L. Schild. The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO* 17: 344-352, 1998
39. Fujita A. und Y. Kurachi. Molecular aspects of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the cardiovascular system and K<sup>+</sup> channel openers. *Pharmacol. Ther.* 85: 39-53, 2000
40. Gamper, N., S. Fillon, S. M. Huber, Y. Fenc, T. Kobayashi, P. Cohen, F. Lang. IGF-1 up-regulates K(+) channels via PI3-kinase, PDK1 and SGK1. *Pflugers Arch.* 443: 625-634, 2002
41. Gattone 2<sup>nd</sup>, V. H., R. L. Maser, C. Tian, J. M. Rosenberg, M. G. Branden. Developmental expression of urine concentration-associated genes and their altered expression in murine infantile-type polycystic kidney disease. *Dev. Genet.* 24: 309-318, 1999
42. Giebisch, G. Renal potassium channels: an overview. *Kidney Int.* 48: 1004-1009, 1995
43. Giebisch, G. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am. J. Physiolol.* 274: F817-F833, 1998
44. Giebisch, G. Physiological roles of renal potassium channels. *Semin. Nephrol.* 19: 458-471, 1999
45. Gögelein, H. R. und R. Greger. Single channel recordings from basolateral and apical membranes of renal proximal tubules. *Pflügers Arch.* 401: 424-426, 1984
46. Grobstein, C. Inductive epithelio-mesenchymal interactions in cultured organ rudiments of the mouse. *Science* 118: 52-55, 1953
47. Grobstein, C. Inductive interaction in the development of the mouse metanephros. *J. Exp. Zool.* 130: 319-340, 1955
48. Grobstein, C. Trans-filter induction of tubules in mouse metanephrogenic mesenchyme. *Exp. Cell Res.* 10: 424-440, 1956
49. Haas, M. und B. Forbush 3rd. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annu. Rev. Physiol.* 62: 515-534, 2000
50. Habener, J. F., C. P. Miller, M. Vallejo. pp. 1-57 in: *Vitamins and Hormones: Advances in Research and Applications*, edited by G. Litwack. Orlando, FL., USA: Academic Press, Inc., 1995

51. Hammerman, M.R. Tissue engineering the kidney. *Kidney Int.* 63: 1195-1204, 2003
52. Harlow, E. und D. Lane. In: *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988
53. Hebert, S. C. General principles of the structure of ion channels. *Am. J. Med.* 104: 87-98, 1998
54. Hebert, S.C. Roles of Na-K-2Cl and Na-Cl cotransporters and ROMK potassium channels in urinary concentrating mechanism. *Am. J. Physiol.* 275: F325-F327, 1998a
55. Hescheler, J., B. K. Fleischmann. Indispensable tools: embryonic stem cells yield insights into the human heart. *J. Clin. Invest.* 108: 363-364, 2001
56. Ho, K., C. G. Nichols, W. J. Lederer, J. Lytton, P. M. Vassilev, M. V. Kanazirska, S. C. Hebert. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362: 31-38, 1993
57. Horster, M.F. Embryonic epithelial membrane transporters. *Am. J. Physiol.* 279: F982-996, 2000
58. Horster, M. F. und M. Sone. Primary culture of isolated tubule cells of defined segmental origin. *Methods Enzymol.* 191: 409-426, 1990
59. Horster, M., S. Huber, J. Tschop, G. Dittrich, G. Braun. Epithelial nephrogenesis. *Pflugers Arch.* 434: 647-660, 1997
60. Horster, M. F., G. S. Braun, S. M. Huber. Embryonic renal epithelia: Induction, nephrogenesis and cell differentiation. *Physiol. Rev.* 79: 1157-1191, 1999
61. Huber, G. C. On the development and shape of uriniferous tubules of certain of the higher mammals. *Am. J. Anat.* 4 Suppl. 47: 1-71, 1905
62. Huber, S. und M. F. Horster. Ontogeny of apical membrane ion conductances and channel expression in cortical collecting duct cells. *Am. J. Physiol.* 271: F698-708, 1996
63. Huber, S. M. und M. F. Horster. Expression of a hypotonic swelling-activated Cl conductance during ontogeny of collecting duct epithelium. *Am. J. Physiol.* 275:F25-F32, 1998
64. Huber, S., G. Braun, A. Burger-Kentischer, B. Reinhart, B. Luckow, M. Horster. CFTR mRNA and its truncated splice variant (TRN-CFTR) are differentially expressed during collecting duct ontogeny. *FEBS Lett.* 423: 362-366, 1998a

65. Huber, S., G. Braun, B. Schröppel, M. Horster. Chloride channels CLC-2 and ICLn mRNA expression differs in renal epithelial ontogeny. *Kidney Int.* 54, Suppl. 67: S149-S151, 1998b
66. Huber, S., G. Braun, M. Horster. Expression of the epithelial sodium channel (ENaC) during ontogenic differentiation of the renal collecting duct epithelium. *Pflügers Arch.* 437: 491-497, 1999
67. Huber, S. M., G. S. Braun, S. Segerer, R. W. Veh, M. F. Horster. Metanephrogenic mesenchyme-to-epithelium transition induces profound expression changes of ion channels. *Am. J. Physiol.* 279: F65-76, 2000
68. Hummler, E. und J. D. Horisberger. Genetic Disorders of Membrane Transport V. The epithelial sodium channel and its implication in human diseases. *Am. J. Physiol.* 276: G567-G571, 1999
69. Inagaki, N., T. Gonoï, J. P. Clement IV, N. Namba, J. Inazawa, G. Gonzalez, L. Aguilar-Bryan, S. Seino, J. Bryan. Reconstitution of  $I_{KATP}$ : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270: 1166-1169, 1995
70. Inagaki, N., Y. Tsuura, N. Namba, K. Masuda, T. Gonoï, M. Horie, Y. Seino, M. Mizuta, S. Seino. Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J. Biol. Chem.* 270: 5691-5694, 1995a
71. Ishida-Takahashi, A., H. Otani, C. Takahashi, T. Washizuka, K. Tsuji, M. Noda, M. Horie, S. Sasayama. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mediates sulphonylurea block of the inwardly rectifying  $K^+$  channel Kir6.1. *J. Physiol. (Lond.)* 508: 23-30, 1998
72. Jentsch, T. J., T. Friedrich, A. Schriever, H. Yamada. The CLC chloride channel family. *Pflügers Arch.* 437: 783-795, 1999
73. Jiang, Y., N. Balkrishna, R. Jahagirdar, L. Reinhardt, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49, 2002
74. Kaissling, B., W. Kriz. Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 56: 1-123, 1979
75. Kawahara, K.  $Ba^{2+}$ -sensitive potassium permeability of the apical membrane in newt kidney proximal tubule. *J. Membrane Biol.* 88: 283-292, 1985
76. Klussmann E., K. Maric, B. Wiesner, M. Beyermann, W. Rosenthal. Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *J. Biol. Chem.* 274: 4934-4938, 1999

77. Koegel, H. und C. Alzheimer. Expression and biological significance of Ca<sup>2+</sup>-activated ion channels in human keratinocytes. *FASEB J.* 15: 145-154, 2001
78. Kohda, Y., W. Ding, E. Phan, I. Housini, J. Wang, R. A. Star, C.-L. Huang. Localization of the ROMK potassium channel to the apical membrane of distal nephron in rat kidney. *Kidney Int.* 54: 1214-1223, 1998
79. Konstas, A. A., A. Bielfeld-Ackermann, C. Korbmacher. Sulfonylurea receptors inhibit the epithelial sodium channel (ENaC) by reducing surface expression. *Pflugers Arch.* 442: 752-761, 2001
80. Kretzler, M., G. Fan, D. Rose, J. L. Arend, J. P. Briggs, L. B. Holzmann. Novel mouse embryonic renal marker gene products differentially expressed during kidney development. *Am. J. Physiol.* 271: F770-777, 1996
81. Kriz, W. und L. Bankir. A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). *Kidney Int.* 33:1-7, 1988
82. Kwon, T.H., H. Hager, L. N. Nejsum, M. L. Andersen, J. Frokiaer, S. Nielsen. Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *Semin. Nephrol.* 21: 231-238, 2001
83. Laich, A., M. Gschwentner, W. Krick, U. O. Nagl, J. Furst, S. Hofer, A. Susanna, A. Schmarada, P. Deetjen, G. Burckhardt, M. Paulmichl. ICLn, a chloride channel cloned from kidney cells, is activated during regulatory volume decrease. *Kidney Int.* 51: 477-478, 1997
84. Lang, F., A. Lepple-Wienhues, I. Szabo, D. Siemen, E. Gulbins. Cell volume in cell proliferation and apoptotic cell death. *Contrib. Nephrol.* 123: 158-168, 1998
85. Lang, F., G. L. Busch, M. Ritter, H. Volkl, S. Waldegger, E. Gulbins, D. Haussinger. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 78: 247-306, 1998a
86. Langman, J. Kapitel 11. Urogenitalsystem. In: *Medizinische Embryologie*, ins Deutsche übersetzt von U. Drews. Stuttgart, Deutschland: Thieme, 1985
87. Lehtonen, E. Epithelio-mesenchymal interface during mouse kidney tubule induction in vivo. *J. Embryol. Exp. Morph.* 34: 695-705, 1975
88. Lesage, F. und M. Lazdunski. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol.* 279: F793-F801, 2000

89. Malhi, H., A. N. Irani, P. Rajvanshi, S. O. Suadicani, D. C. Spray, T. V. McDonald, S. Gupta.  $K_{ATP}$  channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. *J. Biol. Chem.* 275: 26050-26057, 2000
90. Mauerer, U. R., E. L. Boulpaep, A. S. Segal. Properties of an inwardly rectifying ATP-sensitive  $K^+$  channel in the basolateral membrane of renal proximal tubule. *J. Gen. Physiol.* 111: 139-160, 1998
91. Menitt, P. A., J. B. Wade, C. A. Ecelbarger, L. G. Palmer, G. Frindt. Localization of ROMK channels in the rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 1823-1830, 1997
92. Mennitt, P. A., G. Frindt, R. B. Silver, L. G. Palmer. Potassium restriction downregulates ROMK expression in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 278: F916-F924, 2000
93. Minuth, W. W., P. Gross, P. Gilbert, M. Kashgarian. Expression of the  $\alpha$ -subunit of Na/K-ATPase in renal collecting epithelium during development. *Kidney Int.* 31: 1104-1112, 1987
94. Mitani, F., K. Mukai, T. Ogawa, H. Miyamoto, Y. Ishimura. Expression of cytochromes P450ald0 and P45011beta in rat adrenal gland during late gestational and neonatal stages. *Steroids* 62: 57-61, 1997
95. Mizutani, S., Safwat, M. A., Goto, K., Tsujimoto, M., Nakazato, H., Itakura, A., Mizuno, M., Kurauchi, O., Kikkawa, F., Tomoda, Y. Initiating and responsible enzyme of arginine vasopressin degradation in human placenta and pregnancy serum. *Regul. Pept.* 10: 371-378, 1995
96. Morales, M. M., T. P. Carroll, T. Morita, E. M. Schwiebert, O. Devuyst, P. D. Wilson, A. G. Lopes., B. A. Stanton, H. C. Dietz, G. R. Cutting, W. B. Guggino. Both the wild type and a functional isoform of CFTR are expressed in kidney. *Am. J. Physiol.* 270: F1038-F1048, 1996
97. Mullis, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 48: 579-582, 1990
98. Murray, C. B., M. M. Morales, T. R. Flotte, S. A. McGrath-Morrow, W. B. Guggino, P. L. Zeitlin. CIC-2: A developmentally dependent chloride channel expressed in the fetal lung and downregulated after birth. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 12: 597-604, 1995
99. Nichols, C. G. und Lopatin, A. N. Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 171-191, 1997
100. Nonoguchi, H., A. Owada, N. Kobayashi, M. Takayama, Y. Terada, J. Koike, K. Ujiie, F. Marumo, T. Sakai, K. Tomita. Immunohistochemical localization of V2 vasopressin receptor along the nephron and functional role of luminal V2 receptor in terminal inner medullary collecting ducts. *J. Clin. Invest.* 96: 1768-1778, 1995

101. Noulin, J.-F., E. Brochiereo, J.-Y. Lapointe, R. Laprade. Two types of K<sup>+</sup> channels at the basolateral membrane of proximal tubule: inhibitory effect of taurine. *Am. J. Physiol.* 277: F290-F297, 1999
102. Obermüller, N., N. Gretz, W. Kriz, R. F. Reilly, R. Witzgall. The swelling-activated Chloride channel CLC-2, the Chloride channel ClC-3, and ClC-5, a Chloride channel mutated in kidney stone disease, are expressed in distinct subpopulationis of renal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 101: 635-642, 1998
103. Osathanondh, V., E. L. Potter. Development of human kidney as shown by microdissection. IV. Development of tubular portions of nephrons. *Arch. Pathol.* 82: 391-402, 1966
104. Osathanondh, V., E. L. Potter. Development of human kidney as shown by microdissection. V. Development of vascular pattern of glomerulus. *Arch. Pathol.* 82: 403-411, 1966a
105. Ostrowski, N. L., W. S. Young 3<sup>rd</sup>, M. A. Knepper, S. J. Lolait. Expression of vasopressin V1a and V2 receptor messenger ribonucleic acid in the liver and kidney of embryonic, developing, and adult rats. *Endocrinology* 133: 1849-1859, 1993
106. Paillard, M. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger subtypes in the renal tubule: Function and regulation in physiology and disease. *Exp. Nephrol.* 5: 277-284, 1997
107. Panet, R., M. Markus, H. Atlan. Bumetanide and furosemide inhibited vascular endothelial cell proliferation. *J. Cell. Physiol.* 158: 121-127, 1994
108. Peter, K. Untersuchungen über Bau und Entwicklung der Niere. Gustav Fischer, Jena, 1927
109. Phear, G. A, J. Harwood. Protocols for Gene Analysis. In: *Methods in Molecular Biology*, edited by A. J. Harwood, 31: 247-265, Totowa: Humana Press Inc., 1994
110. Pitt, J. C., J. Lindemeier, H. W. Habbes, R. W. Veh. Haptenylation of antibodies during affinity purification: A novel and convenient procedure to obtain labeled antibodies for quantification and double labeling. *Histochem. Cell Biol.* 110: 311-322, 1998
111. Potter, E. L. Normal and abnormal development of the kidney. Yearbook Medical Publ. Inc. Chicago, 1972
112. Pu, W. T., K. Wickman, D. E. Clapham. ICLn Is Essential for Cellular and Early Embryonic Viability. *J. Biol. Chem.* 275: 12363-12366, 2000
113. Quiao, J., D. Cohen, D. Herzlinger. The metanephric blastema differentiates into collecting system and nephron epithelia in vitro. *Development* 121: 3207-3214, 1995

114. Rose, B. D. und H. G. Rennke. Chapter 1. Review of Renal Physiology. In: Renal Pathophysiology. Baltimore, MD, USA: Williams and Wilkins, 1994
115. Rouzaire-Dubois, B., J. B. Milandri, S. Bostel, J. M. Dubois. Control of cell proliferation by cell volume alterations in rat C6 glioma cells. *Pflugers Arch.* 440: 881-888, 2000
116. Russ, U., A. Hambrock, F. Artunc, C. Löffler-Walz, Y. Horio, Y. Kurachi, U. Quast. Coexpression with the inward rectifier K channel Kir6.1 increases the affinity of the vascular sulfonylurea receptor SUR2B for Glibenclamide. *Mol. Pharmacol.* 56: 955-961, 1999
117. Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467, 1977
118. Satlin, L. M. Postnatal maturation of potassium transport in rabbit cortical collecting duct. *Am. J. Physiol.* 266: F57-65, 1994
119. Satlin, L. M. und L. G. Palmer. Apical Na<sup>+</sup> conductance in maturing rabbit principal cell. *Am. J. Physiol.* 270: F391-397, 1996
120. Satlin, L. M. und L. G. Palmer. Apical K<sup>+</sup> conductance in maturing rabbit principal cell. *Am. J. Physiol.* 272: F397-F404, 1997
121. Satoh, E., M. Yamada, C. Kondo, V. P. Repunte, Y. Horio, T. Iijima, Y. Kurachi. Intracellular nucleotide-mediated gating of SUR/Kir6.0 complex potassium channels expressed in a mammalian cell line and its modification by pinacidil. *J. Physiol. (Lond)* 511: 663-674, 1998
122. Saxén, L. Organogenesis of the kidney. In: *Developmental and Cell Biology, Series 19*, edited by P. W. Barlow, P. B. Green, C. C. Wylie. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 1987
123. Schafer, J. A. und S. L. Troutman. cAMP mediates the increase in apical membrane Na<sup>+</sup> conductance produced in rat CCD by vasopressin. *Am. J. Physiol.* 259: F823-F831, 1990
124. Schmitt, R., D. H. Ellison, N. Farman, B. C. Rossier, R. F. Reilly, W. B. Reeves, I. Oberbäumer, R. Tapp, S. Bachmann. Developmental expression of sodium entry in rat nephron. *Am. J. Physiol.* 276: F367-F381, 1999
125. Schuldiner, M., O. Yanuka, J. Itskovitz-Eldor, D. A. Melton, N. Benvenisty. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97:11307-11312, 2000



126. Schwiebert, E. M., D. J. Benos, M. E. Egan, M. J. Stutts, W. B. Guggino. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol. Rev.* 79, Suppl. 1: S145-S166, 1999
127. Sgard, F., C. Faure, C. Drieu la Rochelle, D. Graham, S. E. O'Connor, P. Janiak, F. Besnard. Regulation of ATP-sensitive potassium channel mRNA expression in rat kidney following ischemic injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269: 618-622, 2000
128. Sheppard, D. N. und M. J. Welsh. Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiol. Rev.* 79: S23-S45, 1999
129. Shirihai, O., B. Attali, D. Dagan, S. Merchav. Expression of two inward rectifier potassium channels is essential for differentiation of primitive human hematopoietic progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 177: 197-205, 1998
130. Skatchkov, S. N., A. Thomzig, M. J. Eaton, B. Biedermann, D. Eulitz, A. Bringmann, T. Pannicke, R. W. Veh, A. Reichenbach. Kir subfamily in frog retina: Specific spatial distribution of Kir 6.1 in glial (Muller) cells. *Neuroreport* 12: 1437-1441, 2001
131. Smith, D. B. und K. S. Johnson. Single step purification of polypeptides expressed in escherichia coli as fusion protein with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31-40, 1988
132. Smoak, I. W. Cromakalim: Embryonic effects and reduction of tolbutamide-induced dysmorphogenesis in vitro. *Teratology* 60: 260-264, 1999
133. Somlo, S. und B. Ehrlich. Human disease: Calcium signaling in polycystic kidney disease. *Current Biol.* 11: R356-360, 2001
134. Souza, P., H. O'Brodovich, M. Post. Lung fluid restriction affects growth but not airway branching of embryonic rat lung. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 629-637, 1995
135. Stuart, R.O. und S.K. Nigam. Chapter 2. Developmental biology of the kidney. In: Brenner and Rector's *The Kidney*, 6<sup>th</sup> edition, edited by B. M. Brenner. Philadelphia, PA., USA: W. B. Saunders, 2000
136. Stüber, D., H. Matile, G. Garotta. System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: Application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. In: *Immunological Methods*, Vol IV, edited by I. Levkovits B. Pernis, New York: Academic Press: 121-152, 1990
137. Sugimoto, T., Y. Tanbe, R. Shigemoto, M. Iwai, T. Takumi, H. Ohokubo, S. Nakanishi. Immunohistochemical study of a rat membrane protein which induces a selective potassium permeation: its localization in the apical membrane portion of epithelial cells. *J. Membrane Biol.* 113: 39-47, 1990

138. Suzuki, M., K. Kotake, K. Fujikura, N. Inagaki, T. Suzuki, T. Gono, S. Seino, K. Takata. Kir6.1: A possible subunit of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241: 693-697, 1997
139. Szamosfalvi, B., P. Cortes, R. Alviani, K. Asano, B. L. Riser, G. Zasuwa, J. Yee. Putative subunits of the rat mesangial KATP: a type 2B sulfonylurea receptor and an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel. *Kidney Int.* 61: 1739-1749, 2002
140. Takata, K. Glucose transporters in the transepithelial transport of glucose. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* 45: 275-284, 1996
141. Tanemoto, M., C. G. Vanoye, K. Dong, R. Welch, T. Abe, S. C. Hebert, J. Xu. Rat homolog of sulfonylurea receptor 2B determines glibenclamide sensitivity of ROMK2 in *Xenopus laevis* oocyte. *Am. J. Physiol.* 278: F659-F666, 2000
142. Thomzig, A., M. Wenzel, C. Karschin, M. J. Eaton, S. N. Skatchkov, A. Karschin, R. W. Veh. Kir6.1 is the principal pore-forming subunit of astrocyte but not neuronal plasma membrane K-ATP channels. *Mol. Cell. Neurosci.* 18: 671-690, 2001
143. Tisher, C. C. und K. M. Madsen. Chapter 1. Anatomy of the kidney. In: Brenner and Rector's *The Kidney*, 6<sup>th</sup> edition, edited by B. M. Brenner. Philadelphia, PA, USA: W. B. Saunders, 2000
144. Todd-Turla, K.M., E. Rusvai, A. Naray-Fejes-Toth, G. Fejes-Toth. CFTR expression in cortical collecting duct cells. *Am. J. Physiol.* 270: F237-244. 1996
145. Torban, E., P. R. Goodyer. Effects of PAX2 expression in a human fetal kidney (HEK293) cell line. *Biochem. Biophys. Acta* 1401: 53-62, 1998
146. Tschöp, J., G. S. Braun, R. Borscheid, M. F. Horster, S. M. Huber. Ontogeny of purinergic receptor-regulated Ca<sup>2+</sup> signaling in mouse cortical collecting duct epithelium. *Cell. Physiol. Biochem.* 12: 75-82, 2002
147. Vehaskari, V. M. , J. M. Hempe, J. Manning, D. H. Aviles, M. C. Carmichael. Developmental regulation of ENaC subunit mRNA levels in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 274: C1661-C1666, 1998
148. Watanabe, S., K. Matsushita, P. B. Jr. McCray, J. B. Stokes. Developmental expression of the epithelial Na<sup>+</sup> channels in kidney and uroepithelia. *Am. J. Physiol.* 276: F304-F314, 1999
149. Welch, B. L. On the comparison of several mean values: An alternative approach. *Biometrika.* 38: 330-336, 1959
150. Werner, A., L. Dehmelt, P. Nalbant. Na<sup>+</sup>-dependent phosphate cotransporters: the NaPi protein families. *J. Exp. Biol.* 201: 3135-3142, 1998

151. Wilson, P.D. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the kidney: Clues to its role? *Exp. Nephrol.* 7: 284-289, 1999
152. Winyard, P. J., R. A. Risdon, V. R. Sams, G. R. Dressler, A. S. Woolf. The Pax-2 transcription factor is expressed in cystic and hyperproliferative dysplastic epithelia in human kidney malformations. *J. Clin. Invest.* 98: 451-459, 1996
153. Wonderlin, W. F. und J. S. Strobl. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J. Membr. Biol.* 154: 91-107, 1996
154. Xu, J. Z., A. E. Hall, L. N. Peterson, M. J. Bienkowski, T. E. Eessalu, S. C. Hebert. Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *Am. J. Physiol.* 273: F739-F748, 1997
155. Yamada, M., S. Isomoto, S. Matsumoto, C. Kondo, T. Shindo, Y. Horio, Y. Kurachi. Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulfonylurea-sensitive but ATP-insensitive K<sup>+</sup> channel. *J. Physiol. (Lond.)* 499: 715-720, 1997
156. Yang, Q., Y. Tian, J. Wada, N. Kashihara, E. Wallner, D. Peterson, Y. S. Kanwar. Expression characteristics and relevance of sodium glucose cotransporter-1 in mammalian renal tubulogenesis. *Am. J. Physiol.* 279: F765-777, 2000
157. Yasui, M., S. M. Zelenin, G. Celsi, A. Aperia. Adenylate cyclase-coupled vasopressin receptor activates AQP2 promoter via a dual effect on CRE and AP1 elements. *Am. J. Physiol.* 272: F443-450, 1997
158. Zolotnitskaya, A. und L. M. Satlin. Developmental expression of ROMK in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 276. F825-F836, 1999

# Abkürzungen und Glossar

AA	<i>amino acids</i>
Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	<b>ATP-binding cassette transporter</b>
AC	Adenylatzyklase
AL	aufsteigender Schenkel der jungen Henle' schen Schleife
Annealing	Abschnitt der Polymerasekettenreaktion, bei dem Primer und Matrizen sich entsprechend ihrer Sequenz komplementär aneinanderlagern
AQP	Aquaporin (Wasserkanal)
AVP	Arginin-Vasopressin = Vasopressin = antidiuretisches Hormon (ADH)
BC	Bowman'sche Kapsel
Bp.	Basenpaare
BPE	Rinder-Hypophysenextrakt
cAMP	3', 5'-zyklisches Adenosin-Monophosphat
CCD	Kortikales Sammelrohr
CNT	<i>connecting tubule</i> (= Verbindungssegment)
Confounder	unkontrollierbare Größe, die einen beobachteten Effekt verursacht oder mitverursacht
cDNA	zu mRNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFTR	<b><i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i></b>
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DIC	dual invertierter Kontrast
DL	absteigender Schenkel der jungen Henle' schen Schleife
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide (Mischung aus Adenosin-, Guanosin, Cytidin- und Thymidin-Triphosphat)
DTC	Distaler Tubulus Contortus
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<b><i>enzyme-linked immunosorbent assay</i></b>

---

Exon	für die Transkription bestimmter Sequenzabschnitt eines Gens
Extension	Synthese von cDNA anhand einer Matrize in einer PCR-Reaktion
FCS	fetales Kälberserum
<i>g</i>	Erdbeschleunigung ( $\sim 9,81\text{m/s}^2$ )
g	Gramm
Gene Targeting	Verminderung, Auslöschung oder Steigerung der Expression eines Genprodukts
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
Housekeeper	Gen, dessen Produkt unabhängig vom Funktions- oder Differenzierungszustand einer Zelle exprimiert wird. Meist für basale Zellfunktionen ein essentielles Gen (z.B. des Energiehaushalts oder des Zytoskeletts)
IgG	Immunglobulin G
Intron	nicht für die Transkription bestimmter Sequenzabschnitt eines Gens
Kap.	Kapitel
kD	kilo-Dalton
L-, A-, N-CAM	<i>L-, A-, N- cell adhesion molecule</i>
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{mol}$	Mikromol
M	Molar
MCD	Medulläres Sammelrohr
MD	Makula Densa
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mol	Mol
mM	Millimolar
mmol	Millimol
Monolayer	einschichtiger Zellrasen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NBT/BCIP	<i>nitroblue tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate</i>
ng	Nanogramm

---

nl	Nanoliter
nM	Nanomolar
oligo (dT) <sub>12-18</sub>	Desoxyribonukleinsäure-Ketten aus 12 bis 18 Thymidin- Nukleotiden
OMCD	Sammelrohr des äußeren Nierenmarks
ORCC	<i>outwardly rectifying chloride channel</i>
PAGE	Polyacrylamid Gel-Elektrophorese
patch-clamp	elektrophysiologische Ableitung einzelner Zellen mittels einer Glaspipete, an die Unterdruck angelegt ist. Es können sowohl Ganzzelströme als auch einzelne Kanäle abgeleitet werden.
PAX-2	<i>paired box containing gene-2</i>
pBC	parietales Blatt der Bowman'schen Kapsel
PBS	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pPT	primordialer Proximaler Tubulus
Primer	Oligonukleotidprimer; zur Sequenz eines DNA-Moleküls komplementäre DNA, die der Amplifikation eines DNA-Abschnitts mittels Polymerasekettereaktion dient
pS	Picosiemens
PT	Proximaler Tubulus
RNA	Ribonukleinsäure
RNAsin	RNAase-Inhibitor; Inhibitor RNA-spaltender Enzyme
RT-Minus	Negativ-Kontrolle bei der Polymerasekettenreaktion durch einsetzen von RNA anstatt von cDNA
RT-PCR	<b>R</b> everse- <b>T</b> ranskriptase- <b>P</b> olymerase- <b>K</b> ettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SE	Standardfehler
Splice-Variante	Isoform eines mRNA-Moleküls mit abweichendem Exon-Gehalt
Splicing	enzymatisches Verknüpfen von für die Transkription bestimmten Genabschnitten ( <i>Exons</i> ) zu einem mRNA-Molekül
TAL	dicker aufsteigender Schenkel der Henle' schen Schleife
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNR-CFTR	verkürzte Isoform von CFTR ( <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> )
TTBS	Tween-Tris-gepufferte Salzlösung

---

Tween-20	chemische Eigenschaft: Detergens
UB	Ureterknospe(n)
V	Volt
V2R	Vasopressin-Rezeptor-Typ 2
vBC	viszerales Blatt der Bowman'schen Kapsel
WT-1	<b>Wilms Tumor Suppressor Gen-1</b>
WT-CFTR	<b>Wildtyp-CFTR</b> ( <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> )

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Michael Horster danken, der mir die Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe am Physiologischen Institut vorschlug und mir bei der Bearbeitung des Themas sehr große wissenschaftliche Freiheit ermöglichte. Er war stets am Gelingen dieser Arbeit interessiert und stellte die hierzu notwendige Infrastruktur sicher. Auch unterstützte er mich mit Rat im Verlauf meines klinischen Studienabschnitts.

Herrn PD Dr. rer. nat. Stephan Huber danke ich für ein Betriebsklima, in dem ich mich sofort zu Hause fühlen konnte. Unsere enge Zusammenarbeit hat entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und war von Witz, seiner wissenschaftlichen Intelligenz und von Freundschaft geprägt.

Meinen Mitdoktoranden und -diplomanden Johannes Tschöp, Gregor Dittrich und René Borscheid möchte ich ebenfalls für anregende Diskussionen und die hieraus entstandene Motivation danken. Frau Roswitha Maul (BTA) stand mir im Labor stets mit ihrer sachkundigen Mitarbeit zur Seite.

Ferner gilt mein Dank Herrn Professor Dr. D. Schlöndorff, Direktor der Medizinischen Poliklinik der Universität München, der mir die Möglichkeit gab, einen Teil meiner Experimente im Labor seiner Institution durchzuführen, und Herrn Professor Rüdiger Veh vom Anatomischen Institut der Charité, der mir 'Kir'-Antikörper zur Verfügung stellte.

Schließlich möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Peter Grafe vom Lehrstuhl für Neurophysiologie des Physiologischen Instituts der universität München bedanken: für wichtige Diskussionen über  $K^+$ -Kanäle, sowie für die Möglichkeit, an einem Projekt über purinerge Rezeptoren mitzuarbeiten.

Ich danke meinen heutigen und früheren Freunden für ihre Freundschaft und für ihre zum Teil ganz erhebliche Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit: Katrin, Benedikt, Igor, Heidi, Helge, Susanne, Eddie, Marion, Dagmar, Matthias, ..., meinem Klavierlehrer Victor Ryder.

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern.



# Lebenslauf

**Name:** Gerald Stefan Braun

**Adresse:** Rübzahlstraße 29a, 81739 München

**Geburtsdaten:** 31.03.1975, München

**Eltern:** Dr. jur. Siegfried Braun, Bankangestellter  
Mechthild Braun, geb. Elberfeld, Lehrerin

**Schule:**

1981 – 1985 **Grundschule**, München

1985 – 1994 **Heinrich-Heine-Gymnasium**, München

1990 (4 Monate) Lycée-Raymond-Poincaré, Bar-le-Duc, Frankreich

1992 (4 Monate) St. Andrew's RC School, Ashted, Surrey, England

1994 Abitur in München

**Studium:**

1994 (Nov) – 2001 (Mai) **Studium der Humanmedizin**,  
Ludwig-Maximilians-Universität, München

2000 (Apr) – 2000 (Sep) **Praktisches Jahr**,  
Harvard Medical School, Boston, USA  
in den Fächern Innere Medizin und Neurologie

2000 (Okt) – 2001 (Mär) Kliniken der Universität München  
in den Fächern Neurologie und Chirurgie

2001 (Mai) **3. Staatsexamen**

**Promotion:**

1997 – 2001 Experimentelle Arbeit am **Physiologischen Institut** der  
Universität München, Anstellung als Studentische Hilfskraft

**Stipendien, Preise:**

1998 **Erster Preis, Nephrologisches Forum** München

2000 **Stipendium der Munich-Harvard-Alliance** der Medizinischen  
Fakultät der LMU, München zum sechsmonatigen PJ-Studium an der  
Harvard Medical School, Boston, USA

**Lehre:**

1998 **Tutor** im vorklinischen Kursus der Histologie

2001 **Tutor** im Kursus der Neurologie (NerV)

**Ärztl. Tätigkeit:**

2001 (Okt) – 2003 (Apr) Arzt im Praktikum, **Medizinische Poliklinik** der Universität München,  
Direktor: Prof. D. Schlöndorff

# Veröffentlichungen

## Experimentelle Originalarbeiten

**Braun G.S.**, Veh R.W., Segerer S., Horster M.F., and Huber S.M.

Developmental expression and functional significance of Kir channel subunits in ureteric bud and nephron epithelia.

**European Journal of Physiology - Pflügers Archiv** 455: 321-330, 2002

Tschöp J., **Braun G.S.**, Borscheid R., Horster M.F., and Huber S.M.

Ontogeny of purinergic receptor-regulated Ca<sup>2+</sup> signaling in mouse cortical collecting duct epithelium.

**Cellular Physiology and Biochemistry** 12: 75-82, 2002

Huber S.M., **Braun G.S.**, Segerer S., Veh R.W., and Horster M.F.

Metanephrogenic mesenchyme-to-epithelium transition induces profound expression changes of ion channels.

**American Journal of Physiology** 279: F65-F76, 2000

Huber S.M., Tschöp J., **Braun G.S.**, Nagel W., and Horster M.F.

Bradykinin-stimulated Cl<sup>-</sup> secretion in T84 cells. Role of Ca<sup>2+</sup>-activated hSK4-like K<sup>+</sup> channels.

**European Journal of Physiology - Pflügers Archiv** 438: 53-60, 1999

Huber S.M., **Braun G.S.**, and Horster M.F.

Expression of the epithelial sodium channel (ENaC) during ontogenic differentiation of the renal cortical collecting duct epithelium.

**European Journal of Physiology - Pflügers Archiv** 437: 491-497, 1999

Huber S., **Braun G.**, Burger-Kentischer A., Reinhart B., Luckow B., and Horster M.

CFTR mRNA and its truncated splice variant (TNR-CFTR) are differentially expressed during collecting duct ontogeny.

**FEBS Letters** 423: 362-366, 1998

Huber S., **Braun G.**, Schröppel B., and Horster M.

Cl<sup>-</sup> channels CLC-2 and ICLn mRNA differs in renal epithelial ontogeny.

**Kidney International** 54, Suppl. 67: 149-151, 1998

### Klinische Originalarbeiten

Müller-Höcker J., Schmid H., Weiss M., Dendorfer U., and **Braun G.S.**  
Chloroquine-induced renal failure. Case report and review of the literature.  
**Human Pathology** 34: 285-289, 2003

Schmid H., Struppler C., **Braun G.S.**, Kellner W., and Kellner H.  
Ankle and hindfoot arthropathy in hereditary hemochromatosis.  
**Journal of Rheumatology** 30: 196-199, 2003

### Übersichtsartikel

**Braun G.S.** and Huber S.M.  
Development of renal function (Invited Review).  
**Zoology** 105: 341-354, 2002

Horster M.F., **Braun G.S.**, and Huber S.  
Embryonic renal epithelia, nephrogenesis and cell differentiation (Invited Review).  
**Physiological Reviews** 79: 1157-1191, 1999

Horster M., Huber S., Tschöp J., Dittrich G., and **Braun G.**  
Epithelial Nephrogenesis (Invited Review).  
**European Journal of Physiology - Pflügers Archiv** 434: 647-660, 1997