

**Genexpressionsprofilierung  
von Ionenkanälen in Tiermodellen  
für Herz-Kreislauf-Erkrankungen  
des Menschen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Constanze R. Scherer**  
aus Tübingen

Frankfurt 2002  
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Joachim Engels  
Gutachter: Prof. Dr. Andreas E. Busch  
Prof. Dr. Dr. Ernst Mutschler

Datum der Disputation: 24. Juni 2002

## Abkürzungen und Einheiten

AF	Atriale Fibrillation, Vorhofflimmern
alpha1	Eine Kalziumkanal-Untereinheit des Kaninchens
alpha2	Eine Kalziumkanal-Untereinheit des Kaninchens
ANV	Akutes Nierenversagen
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BLU	Boehringer Light Units, kalibrierte Lichtintensitätswerte, die von der Kamera des Lumi-Imagers registriert werden
bp	Basenpaare
bpm	Schläge pro Minute
CaB2a	Eine Kalziumkanal-Untereinheit des Kaninchens
CaB2b	Eine Kalziumkanal-Untereinheit des Kaninchens
CaB3	Eine Kalziumkanal-Untereinheit des Kaninchens
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLC	Chloridkanal
Da	Dalton (molekulare Masse)
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dNTP	2'-Dideoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
G3PDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
$I_{Ca,L}$	L-Typ-Kalziumstrom
$I_{kur}$	Sehr schnell aktivierender Kaliumauswärtsstrom
$I_{to}$	Schnell aktivierender transienter Kaliumauswärtsstrom
IOD	Integrated Optical Density; Maßeinheit für die Intensität der RT-PCR-Signale
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

Kv-Kanäle	Familie von spannungsabhängigen Kaliumkanälen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SHR	Spontan hypertensive Ratte
SHR-SP	SH-stroke-prone-Ratte
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
WKY	Wistar-Kyoto-Ratte

Meinen Eltern gewidmet

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1	Ionenkanäle im Herzen	3
1.2	CLC-Chloridkanäle	10
1.3	Tiermodelle für Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems	18
1.4	Problemstellung	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1	Chemikalien, Enzyme, Kitsysteme	24
2.2	Puffer und Medien	26
2.3	Tiermodelle	28
2.3.1	Die spontan hypertensive Ratte (SHR) und die SH-stroke-prone-Ratte	28
2.3.2	Die salz-sensitive und die salz-resistente Dahl-Ratte	28
2.3.3	Das Aortic-Banding-Modell in der Ratte	28
2.3.4	Das Herzinsuffizienz-Modell in der Ratte	29
2.3.5	Das Niereninsuffizienz-Modell in der Ratte	29
2.3.6	Das Rapid-Pacing-Modell im Kaninchen	30
2.4	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	31
2.4.1	Hitzeschock	31
2.4.2	Elektroporation	32
2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	32
2.5.1	Minipräparation	32
2.5.2	Midipräparation	33
2.6	Analyse von DNA	34
2.6.1	Restriktionsverdau von DNA	34
2.6.2	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	34
2.6.3	Sequenzierung von DNA	35
2.6.4	Photometrische Analyse	36
2.7	Reinigung von DNA	36
2.7.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	36
2.7.2	Ethanolpräzipitation	37
2.7.3	Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	37
2.8	Modifizierung von DNA	37
2.8.1	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	38
2.8.2	Ligierung von DNA-Fragmenten	38
2.8.3	Linearisierung von Plasmid-DNA	38
2.9	Ein-Schritt- und Zwei-Schritt-RT-PCR	39
2.10	Isolierung von RNA aus tierischem Gewebe	42
2.11	Northern Blot	43
2.11.1	Herstellung nichtradioaktiver Sonden	44
2.11.2	Tüpfeltest	45
2.11.3	Agarose-Gelelektrophorese von RNA	45
2.11.4	Blotting	46
2.11.5	Hybridisierung	47
2.11.6	Waschen und Detektion	48

2.11.7	Auswertung mit dem Lumi-Imager .....	49
2.11.8	Sondenentfernung.....	51
<b>2.12</b>	<b>Auswertung und Statistik .....</b>	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Bluthochdruck und kardiale Hypertrophie und die Genexpression der CLC-Chloridkanäle.....</b>	<b>53</b>
3.1.1	Das Modell der spontan hypertensiven Ratte (SHR).....	55
3.1.2	Das Modell der SH-stroke-prone-Ratte (SHR-SP).....	58
3.1.3	Das Modell der salz-sensitiven Dahl-Ratte .....	61
3.1.4	Das Modell der Aortic-Banding-Ratte .....	62
<b>3.2</b>	<b>Herzinsuffizienz und die Genexpression der CLC-Chloridkanäle .....</b>	<b>66</b>
3.2.1	Das Herzinsuffizienz-Modell in der Ratte .....	66
<b>3.3</b>	<b>Niereninsuffizienz und die Genexpression der CLC-Chloridkanäle.....</b>	<b>69</b>
3.3.1	Das Niereninsuffizienz-Modell in der Ratte: Studie I.....	69
3.3.2	Validierung durch die Genexpression von NHE-3 .....	74
3.3.3	Einfluss der NHE-3-Blockade auf die Genexpression der CLC-Chloridkanäle: Studie II	76
<b>3.4</b>	<b>Atriale Fibrillation und die Genexpression von Kalium- und Kalziumkanal-Untereinheiten .....</b>	<b>91</b>
3.4.1	Optimierung der RT-PCR-Bedingungen .....	91
3.4.2	Die Genexpression der für den $I_{to}$ Kaliumstrom verantwortlichen Kaliumkanal-Untereinheiten: Kv4.3, Kv4.2 und Kv1.4 .....	95
3.4.3	Die Genexpression der Kaliumkanal-Untereinheit Kv1.5.....	99
3.4.4	Die Genexpression der für den $I_{Ca,L}$ Kalziumstrom verantwortlichen Kalziumkanal-Untereinheiten: alpha1, alpha2, CaB2a, CaB2b und CaB3.....	100
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>105</b>
<b>4.1</b>	<b>Die CLC-Chloridkanäle und ihre mögliche Bedeutung für die kardiovaskulären Erkrankungen Bluthochdruck, kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz..</b>	<b>105</b>
<b>4.2</b>	<b>Die CLC-Chloridkanäle und ihre mögliche Bedeutung für die Niereninsuffizienz.....</b>	<b>108</b>
4.2.1	Die Veränderung der Genexpression der CLC-Chloridkanäle.....	108
4.2.2	Einfluss der NHE-3-Hemmung auf die Genexpression der CLC-Chloridkanäle.....	111
<b>4.3</b>	<b>Kalium- und Kalziumkanal-Untereinheiten und ihre Bedeutung für die atriale Fibrillation .....</b>	<b>112</b>
4.3.1	Die Genexpression der Kaliumkanal-Untereinheiten .....	112
4.3.2	Die Genexpression der Kalziumkanal-Untereinheiten .....	114
<b>4.4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>116</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>118</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>138</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>141</b>

## 1 Einleitung

Zellmembranen bestehen aus einer Doppelschicht von Lipidmolekülen und sind daher für Ionen undurchlässig. Deshalb erfolgt der Transport von Ionen in die Zelle und aus der Zelle heraus oder zwischen verschiedenen intrazellulären Kompartimenten mit Hilfe von Membranproteinen, welche als Ionenkanäle, Transporter oder Pumpen bekannt sind. Ionenkanäle finden sich in den Membranen aller Zellen, bei Tieren, Pflanzen, Bakterien und beim Menschen. Sie spielen dort eine wichtige Rolle in den unterschiedlichsten Prozessen, wie zum Beispiel bei der Erregbarkeit von Nerven und Muskeln, der Hormonsekretion, der Zellproliferation, der Weiterleitung von Sinnesreizen, der Kontrolle des Salz- und Wasserhaushaltes und der Regulation des Blutdruckes. Liegen Störungen in der Funktion der Ionenkanäle vor, so können diese massive physiologische Auswirkungen haben.

Die Aktivität von Ionenkanälen kann auf mehrere Arten gesteuert werden, weshalb sich die Ionenkanäle in verschiedene Gruppen einteilen lassen: Hierzu gehören die spannungsgesteuerten Kanäle (voltage-gated), die durch Änderung der Membranspannung zu einer Konformationsänderung angeregt werden. Eine zweite Gruppe beinhaltet die Kanäle, die durch eine Transmitter- oder Ligandenbindung (ligand-gated) aktiviert werden. Eine weitere Gruppe umfasst diejenigen Kanäle, die auf mechanischen Druck oder Zug reagieren. In der vorliegenden Arbeit wurden Ionenkanäle der ersten Gruppe untersucht.

### **1.1 Ionenkanäle im Herzen**

Aufgrund eines Stimulus von außen, wie zum Beispiel durch die Veränderung des Membranpotentials, können Ionenkanäle eine Pore öffnen oder schließen und damit eine Bewegung der Ionen in die Zelle oder aus der Zelle heraus ermöglichen. Das Zusammenspiel Tausender gleichartiger Ionenkanäle in einer einzelnen Zelle führt zu einem Ionenstrom, und das Zusammenspiel vieler verschiedener Ionenströme bildet das charakteristische Aktionspotential. Deshalb sind die Ionenkanäle die Grundbausteine für die elektrische Aktivität des Herzens. Ist die Struktur, die Funktion oder die Zahl der Ionenkanäle verändert, kann dies zu Arrhythmien führen. Eine Veränderung der Ionenkanalfunktion kann zum Beispiel durch eine akute Ischämie, eine veränderte Menge an zirkulierenden Neurohormonen oder durch eine intrazelluläre Überladung mit Kalzium erfolgen. Traditionelle Therapieansätze zur Behandlung von Arrhythmien stützen sich unter anderem auf Arzneimittel, die direkt einen oder mehrere Ionenkanäle blockieren.

## Einleitung

---

Die Klonierung des ersten Ionenkanals erfolgte im Jahr 1984 (Noda *et al.*, 1984). Seither gab es interessante neue Erkenntnisse über ihre Physiologie und ihren molekularen Wirkungsmechanismus. Häufig konnten die Ursachen der veränderten elektrischen Erregbarkeit sowohl bei genetisch bedingten Krankheiten als auch bei erworbenen Krankheiten, wie der kardialen Hypertrophie oder der Ischämie, auf Defekte von Ionenkanälen zurückgeführt werden. Dieses Wissen ermöglicht zum einen eine verbesserte Diagnose der Erkrankung und zum anderen eine wirkungsvollere Therapie der Krankheiten, wie beispielsweise von Arrhythmien.

### Das Aktionspotential

Das Aktionspotential im Herzen ist der Verlauf der Spannung an der kardialen Zellmembran als Funktion der Zeit (Hille, 1992). Diese Spannung wird durch den Fluss individueller Ionen durch die Zellmembran verändert (siehe Abbildung 1): Ein Natriumeinwärtsstrom ( $I_{Na}$ ) ist für den schnellen Anstieg des Aktionspotentials verantwortlich. Auf diesen folgt ein Kaliumauswärtsstrom ( $I_{to}$ ). Daraufhin sorgt ein Gleichgewicht zwischen dem Kalziumeinwärtsstrom ( $I_{Ca,L}$  und  $I_{Ca,T}$ ) und dem Kaliumauswärtsstrom ( $I_{Kur}$ ) für die Entstehung der Plateauphase. Die Kaliumströme  $I_{Ks}$  und  $I_{Kr}$  erzeugen schließlich den verzögerten Gleichrichter-Strom („delayed rectifier“) und sind wie der  $I_{K1}$ -Strom für die sich anschließende Repolarisation verantwortlich (Snyders, 1999). Außerdem sind noch ein durch Acetylcholin aktivierter Kaliumstrom ( $I_{KAch}$ ), ein Chloridstrom ( $I_{Cl}$ ), ein schwach einwärtsrektifizierender Kaliumstrom ( $I_{Kp}$ ) und ein unter pathophysiologischen Bedingungen aktivierter Kaliumstrom ( $I_{KATP}$ ) an der Repolarisation beteiligt. Des Weiteren ist der von den extra- bzw. intrazellulären  $Na^+$ - bzw.  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen abhängige Austauschstrom  $I_{Na/Ca}$  für die Modulation des Aktionspotentials von Bedeutung (Snyders, 1999).

## Einleitung

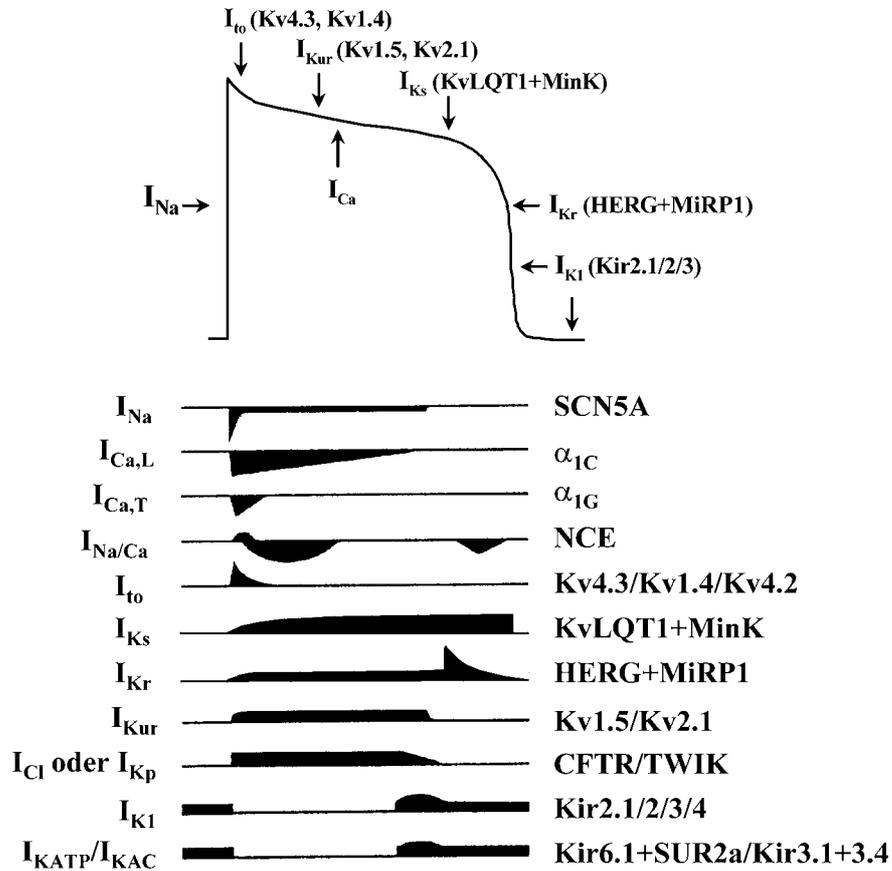


Abbildung 1: Darstellung der Ionenströme und der dazugehörigen Gene, die an der Entstehung des kardialen Aktionspotentials beteiligt sind (Brown, 1997; Snyders, 1999).

Ganz oben sieht man eine Abbildung des Aktionspotentials im Herzen. Darunter wird der Zeitverlauf der depolarisierenden Ioneneinwärtsströme und der repolarisierenden Ionenauswärtsströme dargestellt. Auf der rechten Seite sind die für die Ionenströme verantwortlichen Gene aufgeführt.

$I_{Na}$	Natriumeinwärtsstrom
$I_{Ca}$	Kalziumeinwärtsstrom
$I_{Na/Ca}$	Natrium-Kalzium-Austauscherstrom
$I_{to}$	Kaliumauswärtsstrom „transient outward“
$I_{Ks}$	Kaliumauswärtsstrom „slow“, langsam aktivierend
$I_{Kr}$	Kaliumauswärtsstrom „rapid“, schnell aktivierend
$I_{Kur}$	Kaliumauswärtsstrom „ultra rapid“, sehr schnell aktivierend
$I_{Kp}$	Kaliumauswärtsstrom
$I_{Cl}$	Chloridstrom
$I_{K1}$	einwärtsrektifizierender Kaliumstrom
$I_{KATP}/I_{KAC}$	Kaliumauswärtsströme, durch Acetylcholin oder ATP aktiviert

**Die molekularen Grundlagen der Ionenströme  $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$ , und  $I_{Ca,L}$**

Die Ionenkanäle, die für die Kaliumströme  $I_{to}$  und  $I_{Kur}$  sowie für den L-Typ-Kalziumstrom  $I_{Ca,L}$  verantwortlich sind, spielen in der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle. Deshalb wird die Struktur dieser Ionenkanäle genauer erläutert.

Die Kaliumkanäle Kv4.3, Kv4.2, Kv1.4 und Kv1.5 gehören zur Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle. Das jeweilige Kanalprotein durchspannt die Membran mit sechs Domänen (S1-S6) und sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus sind intrazellulär lokalisiert (siehe Abbildung 2A). Die Pore befindet sich zwischen den Bereichen S5 und S6. Diese Porenschleife wird als H5-Region bezeichnet. Im S4-Segment liegt der Spannungssensor, der durch 4-8 positiv geladene Aminosäuren gebildet wird und für die Spannungsabhängigkeit des Kanals verantwortlich ist. Die Zusammenlagerung von vier Untereinheiten zu einem Tetramer ist die Voraussetzung für die Bildung eines funktionellen Kaliumkanals (siehe Abbildung 2B).

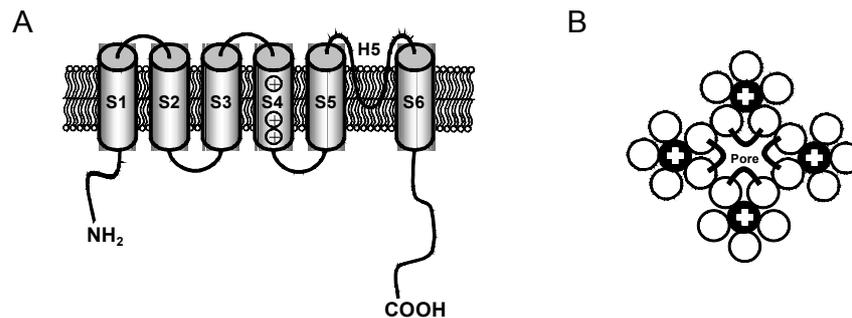


Abbildung 2: Die molekulare Struktur eines spannungsabhängigen Kaliumkanals. **A** Eine Untereinheit mit sechs Transmembran-Segmenten (S1-S6) ist hier dargestellt. Der N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Die Pore befindet sich zwischen den Bereichen S5 und S6, und im S4-Segment liegt der Spannungssensor. **B** Vier Untereinheiten lagern sich zu einem Tetramer zusammen und bilden einen funktionsfähigen Kanal.

Die Untereinheiten Kv4.3, Kv4.2 und Kv1.4 erzeugen transiente Auswärtsströme, die an die Eigenschaften des Kaliumstromes  $I_{to}$  erinnern (Serodio *et al.*, 1996; Dixon *et al.*, 1996; Yeola und Snyders, 1997). Diese drei Untereinheiten sind jedoch nicht in allen Spezies für den  $I_{to}$  verantwortlich. So galt die Untereinheit Kv1.4 im menschlichen Herzen immer als ein Kandidat für den  $I_{to}$  (Näbauer *et al.*, 1996); inzwischen wird dies jedoch aufgrund der unterschiedlichen kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften der *in vitro* gemessenen Ströme im Vergleich zu den Eigenschaften des nativen  $I_{to}$ -Stromes eher ausgeschlossen (Po *et al.*, 1992; McKinnon, 1999). Die Bedeutung von Kv1.4 im Herzen der Ratte wird widersprüchlich diskutiert, da die Protein-Expression von Kv1.4 nicht eindeutig im Herzen der Ratte

## Einleitung

nachgewiesen werden konnte (Barry *et al.*, 1995; Wickenden *et al.*, 1999). Im Kaninchen hingegen scheint Kv1.4 eine wichtige Rolle zu spielen (Wang *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu passen die Eigenschaften der *in vitro* gemessenen Ströme der Untereinheit Kv4.2 nur in der Ratte sehr gut zu den Eigenschaften des  $I_{to}$  (Barry *et al.*, 1995; Dixon und McKinnon, 1994). Die verwandte Isoform Kv4.3 ist sowohl in der Ratte als auch im Kaninchen und im Menschen sehr stark exprimiert (Serodio *et al.*, 1996; Dixon *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999). Das heißt also, dass der den  $I_{to}$  erzeugende Kaliumkanal in der Ratte vor allem durch die Untereinheiten Kv4.3 und Kv4.2, beim Mensch hingegen wahrscheinlich vor allem durch Kv4.3 und im Kaninchen durch Kv1.4, Kv4.2 und Kv4.3 gebildet wird.

Die Untereinheit Kv1.5 ist die Hauptkomponente des Kaliumstromes  $I_{Kur}$  im Vorhof des menschlichen Herzens (Tamkun *et al.*, 1991). Die starke Ähnlichkeit der Eigenschaften der *In-vitro*-Ströme homomerer Kv1.5 Kanäle mit dem nativen Kaliumstrom  $I_{Kur}$  lässt vermuten, dass Kv1.5 im Menschen als Homotetramer für diesen Strom verantwortlich ist (Wang *et al.*, 1993). Sowohl im Menschen als auch in der Ratte ist das Protein im Herzen nachweisbar (Mays *et al.*, 1995). Außerdem wurde Kv2.1 als weiterer Kandidat für  $I_{Kur}$  in der Maus vorgeschlagen (Xu *et al.*, 1999a,b). Im Kaninchen ist der Kaliumstrom  $I_{Kur}$  zwar noch nicht beschrieben worden, aber Kv1.5 ist auf RNA-Ebene exprimiert.

Der spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanal wird aus fünf Proteinuntereinheiten zusammengesetzt (Striessnig, 1999; Catterall, 2000). Der Komplex beinhaltet die  $\alpha_1$ -Untereinheit (190 kDa), welche die Membran durchspannt und mit der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit (Dimer, 170 kDa) verbunden ist, eine intrazelluläre  $\beta$ -Untereinheit (55 kDa) und eine  $\gamma$ -Untereinheit (33 kDa) (siehe Abbildung 3).

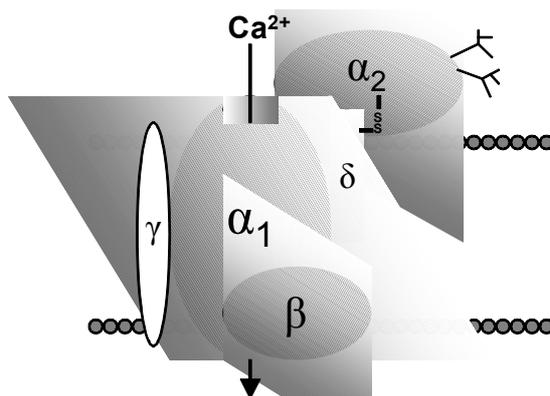


Abbildung 3: Der L-Typ-Kalziumkanalkomplex besteht aus den fünf Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2$ ,  $\delta$  und  $\gamma$ . Die Existenz einer  $\gamma$ -Untereinheit im Herzen konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden.

## Einleitung

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit ist ein Protein, bestehend aus ungefähr 2000 Aminosäuren (Cooper *et al.*, 1987). Die Struktur der Untereinheit besteht aus vier sich wiederholenden Domänen (I-IV), von denen jede aus sechs die Membran durchspannenden Segmenten (S1 bis S6) und einer Schleife zwischen S5 und S6 besteht (siehe Abbildung 4). S5 und S6 bilden zusammen mit der dazwischen liegenden Schleife die Pore. Im S4-Segment liegt der Spannungssensor. Von den zehn bekannten Isoformen im Menschen wird nur die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit in großen Mengen im Herzen exprimiert (Takimoto *et al.*, 1997).

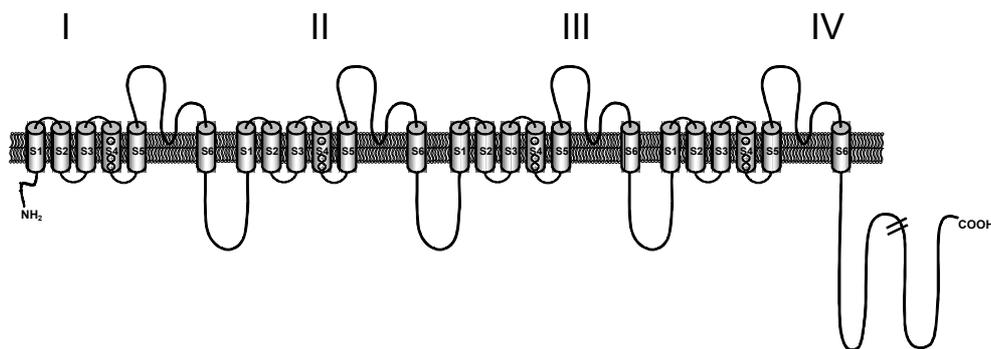


Abbildung 4: Die Struktur der  $\alpha_1$ -Untereinheit. Die  $\alpha_1$ -Untereinheit besteht aus vier sich wiederholenden Domänen (I bis IV). Die Segmente S5 und S6 in jeder Domäne bilden zusammen mit der dazwischen liegenden Schleife die Pore. In dem Segment S4 befindet sich der Spannungssensor.

Die  $\beta$ -Untereinheit liegt intrazellulär; von den vier bekannten Isoformen wird nur die  $\beta_2$ -Untereinheit im menschlichen Herzen gefunden (Pichler *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 1997). Die  $\gamma$ -Untereinheit ist ein Glykoprotein mit vier die Membran durchspannenden Segmenten. Sie konnte jedoch bisher im Herzen nicht nachgewiesen werden (Eberst *et al.*, 1997). Die  $\alpha_2$ -Untereinheit besitzt viele Glykosylierungsstellen. Sie liegt extrazellulär und ist über Disulfidbrücken mit der  $\delta$ -Untereinheit verbunden. Die humanen Isoformen 1 und 2 der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit werden im Herzen exprimiert (Klugbauer *et al.*, 1998). Die erste klonierte kardiale  $\alpha_1$ -Untereinheit stammt aus dem Kaninchen (Mikami *et al.*, 1989). Außerdem sind im Kaninchen die  $\alpha_2$ -Untereinheit (Ellis *et al.*, 1988) und drei Isoformen der kardialen  $\beta$ -Untereinheit, die als CaB2a, CaB2b und CaB3 bezeichnet werden (Hullin *et al.*, 1992), bekannt.

### Aktionspotentiale im erkrankten Gewebe

Die Konfiguration und die Dauer des Aktionspotentials können bei einer Erkrankung als Folge von Modifikationen in einzelnen Ionenströmen verändert sein. So sind zum Beispiel Aktionspotentiale, die in kardialen Zellen von hypertrophen Herzen aufgenommen werden,

verlängert (Aronson, 1991). Die Ursache hierfür ist eine Änderung des Gleichgewichts zwischen einwärts- und auswärtsfließenden Strömen während der Plateauphase, wie zum Beispiel ein verstärkter Kalziumstrom oder ein verringerter Kaliumstrom (Kääb *et al.*, 1998). Die Aktionspotentiale ventrikulärer Herzzellen von Patienten mit Kardiomyopathie sind ebenso verlängert (Beuckelmann *et al.*, 1993). Der hierbei zugrunde liegende Mechanismus ist sehr wahrscheinlich eine Abnahme des Kaliumstromes  $I_{to}$ . Ähnliches wird bei Aktionspotentialen beobachtet, die in der Grenzzone eines Herzinfarktes aufgenommen werden (Lue und Boyden, 1992). Es zeigt sich hier eine Abnahme der  $I_{to}$ - und der Natriumströme. Als weiteres Beispiel ist das Vorhofflimmern zu nennen. Hierbei ist die Aktionspotentialdauer verkürzt, wodurch die elektrophysiologischen Eigenschaften der Vorhöfe verändert werden. Sowohl der Kalziumstrom  $I_{Ca,L}$  als auch einige Kaliumströme ( $I_{to}$ ,  $I_{Kur}$  und  $I_{K1}$ ) sind hierbei reduziert (Bosch *et al.*, 2000).

### **Ionenkanäle als Ziele für die antiarrhythmische Therapie**

Die ersten Arzneimittel zur Behandlung von Arrhythmien, wie Digitalis und Chinidin, wurden ohne das Wissen ihrer Aktionsmechanismen eingesetzt. Durch die Identifizierung der einzelnen Ionenströme ist eine gezieltere Therapie möglich geworden. Inzwischen werden die Arzneimittel auf der Grundlage der elektrophysiologischen Substanz-Effekte am myokardialen Aktionspotential in vier verschiedene Klassen (nach Vaughan Williams, 1979) eingeteilt. Die Klasse I besteht aus Natriumkanalblockern, wie zum Beispiel Chinidin, Procainamid, Lidocain, Flecainid und Ajmalin. Diese verringern die Aufstrichsteilheit des Aktionspotentials und können wiederum je nach Beeinflussung der Aktionspotentialdauer in drei Unterklassen eingeteilt werden. Die Klasse II beinhaltet die Betarezeptorenblocker, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll. Die Klasse III besteht aus Substanzen, die vorrangig Kaliumkanäle blockieren und die Aktionspotentialdauer bzw. die Refraktärzeit verlängern. Hierzu gehören Amiodaron und Sotalol, welches außerdem eine betablockierende Wirkung hat. In der Klasse IV befinden sich Kalziumkanalblocker, wie zum Beispiel Verapamil oder Diltiazem.

Ein großes Problem der Antiarrhythmika ist ihr proarrhythmischer Effekt, das heißt, dass durch die Einnahme der Arzneimittel ebenfalls Arrhythmien hervorgerufen werden können. Die Ursache hierfür ist eine Blockade bestimmter Ionenkanäle auch bei normaler Herzfrequenz.

### **Die Rolle einiger kardialer Ionenkanäle bei Erkrankungen**

Aufgrund des wachsenden Verständnisses bezüglich der molekularen Vielfalt, Struktur und Funktion von Ionenkanälen konnte die Pathophysiologie einiger Erkrankungen nach Entdeckung von Mutationen in verschiedenen Ionenkanälen aufgeklärt werden. Besonders gut untersucht ist das Long-QT-Syndrom (LQT-Syndrom). Hierbei ist das QT-Intervall im EKG

verlängert, was zu Synkopen und Kammerflimmern führen kann. Es gibt eine autosomal rezessive Form (Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom), die zusammen mit einer Schwerhörigkeit auftreten kann. Außerdem gibt es die häufiger auftretende autosomal dominante Form (Romano-Ward-Syndrom). Bisher sind sechs Gene bekannt, die für diese Arrhythmieformen verantwortlich sind (Keating und Sanguinetti, 2001). Neben dem vererbten gibt es auch das erworbene LQT-Syndrom. Als Ursachen können zum Beispiel bestimmte Herzerkrankungen, Elektrolytstörungen, bestimmte Gifte oder Arzneimittel genannt werden (Roden, 1998). Beispiele für Arzneimittel sind Antihistaminika wie Terfenadin, Antibiotika wie Erythromycin oder auch Antiarrhythmika wie Sotalol. Alle diese Substanzen blockieren die HERG-Kaliumkanäle, wodurch die Repolarisation während des Aktionspotentials verlangsamt wird.

## 1.2 CLC-Chloridkanäle

Chlorid ist das vorherrschende Anion im extrazellulären Milieu. Verschiedene Transporter und Kanäle nehmen an der Translokation von Chloridionen über die zelluläre Plasmamembran und die Membran von intrazellulären Organellen teil. Die Chloridkanäle sind in viele verschiedene physiologische Prozesse involviert, wie die Regulation der zellulären Erregbarkeit, den transepithelialen Transport, die Regulation des Zellvolumens und die Ansäuerung intrazellulärer Organellen.

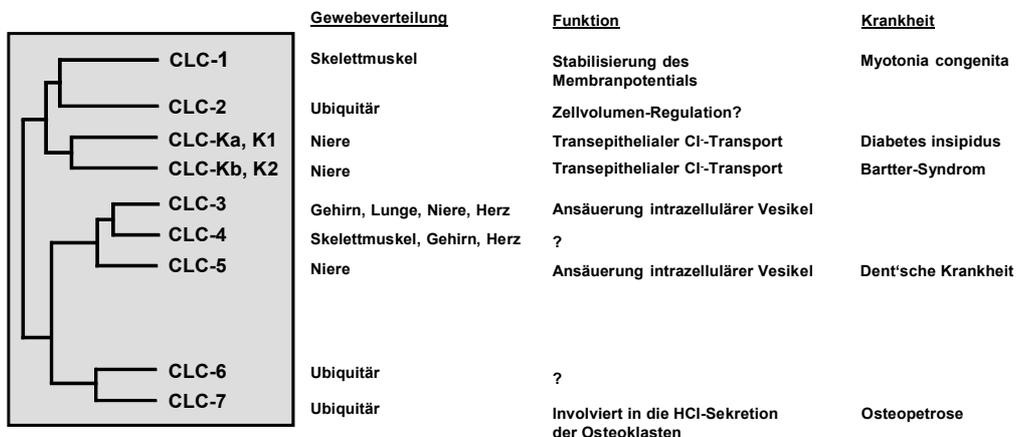


Abbildung 5: Der Stammbaum der CLC-Chloridkanal-Familie zeigt die Verwandtschaft zwischen den einzelnen Mitgliedern. Die Familie gliedert sich in drei Äste, die weniger als 30% identisch zueinander sind. Die Mitglieder des ersten Astes, CLC-1, CLC-2, CLC-Ka und CLC-Kb bzw. CLC-K1 und CLC-K2 (in der Ratte), sind am engsten mit CLC-0, dem Gründungsmitglied der Familie, verwandt. Der zweite Ast beinhaltet die Chloridkanäle CLC-3, CLC-4 und CLC-5 und der dritte Ast die Chloridkanäle CLC-6 und CLC-7.

## Einleitung

Seit 1990 ist ein spannungsabhängiger Chloridkanal (CLC-0) bekannt, der aus dem elektrischen Organ des elektrischen Fisches *Torpedo marmorata* isoliert wurde (Jentsch *et al.*, 1990). Die Familie der CLC-Chloridkanäle besteht aus neun Mitgliedern in Säugetieren, die eine unterschiedliche Gewebeverteilung und Funktion sowohl in der Plasmamembran als auch in intrazellulären Organellen aufweisen (siehe Abbildung 5). Man findet die CLC-Chloridkanäle in vielen Organismen, wie Tieren, Pflanzen, Hefen und Bakterien (Jentsch *et al.*, 1999; Waldegger und Jentsch, 2000). Die Topologie der CLC-Chloridkanäle ist am CLC-1 ausgiebig untersucht worden (siehe Abbildung 6). Der N- und der C-Terminus des Proteins befinden sich intrazellulär. Die Hydrophathie-Analyse zeigt, dass 10 bis 12 Transmembran-Domänen existieren. Die Unsicherheit über die genaue Anzahl der Domänen resultiert aus einer großen hydrophoben Region am C-terminalen Ende des Proteins, welche sehr schwer zu analysieren ist. Man weiß deshalb immer noch nicht, ob diese Region die Membran drei- oder fünfmal durchspannt. Außerdem ist unklar, ob die D4-Domäne extrazellulär liegt oder die Membran durchspannt. Am intrazellulären C-terminalen Ende befinden sich zwei CBS-Domänen, welche zuerst in der Cystathionin- $\beta$ -Synthase (CBS) beschrieben wurden, deren Funktion bisher aber nicht geklärt ist.

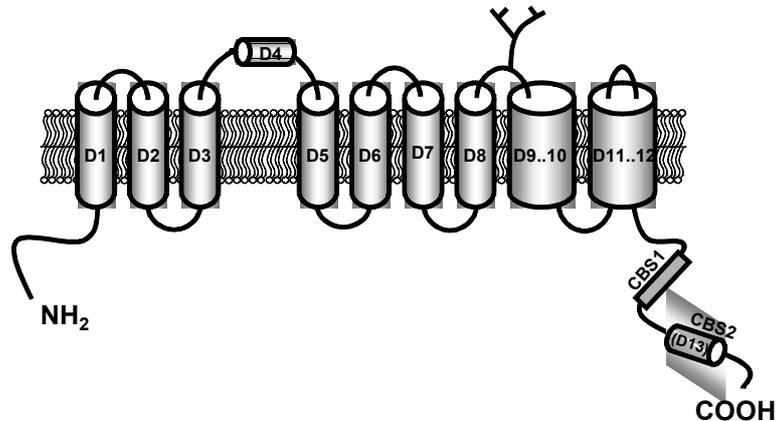


Abbildung 6: Modell der molekularen Struktur der CLC-Chloridkanäle (Schmidt-Rose und Jentsch 1997). Der N- und der C-Terminus liegen demnach intrazellulär. Außerdem gibt es eine Glykosylierungsstelle zwischen den Transmembran-Regionen D8 und D9 und zwei CBS-Domänen im intrazellulären Teil des C-Terminus.

Die CLC-Chloridkanäle liegen wahrscheinlich als Dimere vor, wobei jedes Monomer eine Pore bildet („double-barreled“-Struktur). Dies wurde an CLC-0 ausgiebig studiert, jedoch bisher nicht für alle Mitglieder der Familie gezeigt. In diesem Modell besteht der Kanal aus zwei identischen Poren, die unabhängig voneinander öffnen und schließen können (schnelles Schalten).

Außerdem können die beiden Poren von einem gemeinsamen Mechanismus geschaltet werden. Man spricht dann vom langsamen Schalten (Miller und White, 1982; Hanke und Miller, 1983). Eine erste Kristallstrukturanalyse des EriC, einem prokaryontischen CLC-Chloridkanal, unterstützt die dimere Struktur des Kanals mit zwei Poren (Mindell *et al.*, 2001).

### **Der Skelettmuskel-Chloridkanal CLC-1**

CLC-1 wird fast ausschließlich im Skelettmuskel exprimiert und ist für die Ruhemembranleitfähigkeit des Muskels und die Repolarisation der Muskelfasermembran verantwortlich (Steinmeyer *et al.*, 1991a). Mutationen im CLC-1-Gen können sowohl in der Maus (Steinmeyer *et al.*, 1991b) als auch im Menschen (Koch *et al.*, 1992 und 1993; Steinmeyer *et al.*, 1994) zu Myotonie, einer Übererregbarkeit des Skelettmuskels, führen.

### **Der Chloridkanal CLC-2**

CLC-2 ist ein ubiquitär exprimierter Chloridkanal (Thiemann *et al.*, 1992), der durch starke Hyperpolarisation des Membranpotentials, Zellschwellung (Gründer *et al.*, 1992) und einen erniedrigten extrazellulären pH-Wert (Pusch und Jentsch, 1994; Jordt und Jentsch, 1997) aktiviert wird. Durch Hyperpolarisation aktivierte Ströme, die den durch CLC-2 erzeugten Strömen (exprimiert in *Xenopus*-Oozyten) gleichen, sind in verschiedenen Zelllinien beschrieben worden (Fritsch und Edelman, 1996; Fritsch und Edelman, 1997). Deshalb könnte CLC-2 an der Zellvolumenregulation beteiligt sein. CLC-2 ist eventuell auch für die intrazelluläre Chloridkonzentration in Neuronen und für die Regulation der neuronalen Erregbarkeit verantwortlich (Smith *et al.*, 1995; Staley *et al.*, 1996). Des Weiteren wird eine Funktion von CLC-2 bei der Chloridsekretion im Lungenepithelgewebe (Schwiebert *et al.*, 1998), bei der Säuresekretion im Magenepithelgewebe (Malinowska *et al.*, 1995; Sherry *et al.*, 1997) und bei der Zellvolumenregulation im Leberepithelgewebe (Roman *et al.*, 2001) beschrieben. Außerdem ist in einer Arbeit ein einwärtsrektifizierender Chloridstrom,  $I_{Cl,ir}$ , im Herzen von Mäusen und Meerschweinchen beobachtet worden (Duan *et al.*, 2000), dessen Eigenschaften mit denen der *in vitro* gemessenen CLC-2-Ströme übereinstimmen. CLC-2 kommt sowohl im Atrium als auch im Ventrikel des Herzens vor (Britton *et al.*, 2000). Deshalb könnte CLC-2 eine wichtige Rolle bei der Regulation der elektrischen Aktivität und des Zellvolumens im Herzen spielen. Entgegengesetzt allen Vermutungen zeigen Knock-out-Mäuse außer der Degeneration der Retina und der Testis keine Beeinträchtigung anderer Funktionen (Bösl *et al.*, 2001). CLC-2 scheint demnach eine Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion der Sertoli-Zellen in den Testis und der Pigmentepithelzellen in der Retina zu spielen. Die Degeneration beginnt, sobald diese Zellen anfangen, die Blut-Testis- bzw. die Blut-Retina-Schranke zu bilden.

### Die nierenspezifischen CLC-K-Chloridkanäle

In der Niere gibt es zwei sehr homologe CLC-Proteine, die fast ausschließlich in diesem Gewebe exprimiert werden (Uchida *et al.*, 1993; Adachi *et al.*, 1994; Kieferle *et al.*, 1994). Aufgrund ihrer hohen Identität von 90% werden diese beiden Kanäle als CLC-Ka und CLC-Kb im Menschen (Kieferle *et al.*, 1994) und als CLC-K1 und CLC-K2 in der Ratte und in der Maus (Adachi *et al.*, 1994; Matsumara *et al.*, 1999) bezeichnet. Es ist beschrieben, dass das CLC-K1-Protein sowohl in den apikalen als auch in den basolateralen Plasmamembranen des dünnen aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife lokalisiert ist (Uchida *et al.*, 1995). In dehydrierten Tieren kommt es zu einem Anstieg der CLC-K1-Expression parallel zur Konzentrierung des Urins (Uchida *et al.*, 1993; Vandewalle *et al.*, 1997). Mit Hilfe einer Knock-out-Maus ist die Bedeutung von CLC-K1 im dünnen aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife bestätigt worden (Matsumara *et al.*, 1999). CLC-K1 ist demnach verantwortlich für den transepithelialen Chlorid-Transport und damit für die Konzentrierung des Urins (siehe Abbildung 7). Die Knock-out-Maus ist durch einen Diabetes insipidus, das heißt ein massiv erhöhtes Harnvolumen, gekennzeichnet.

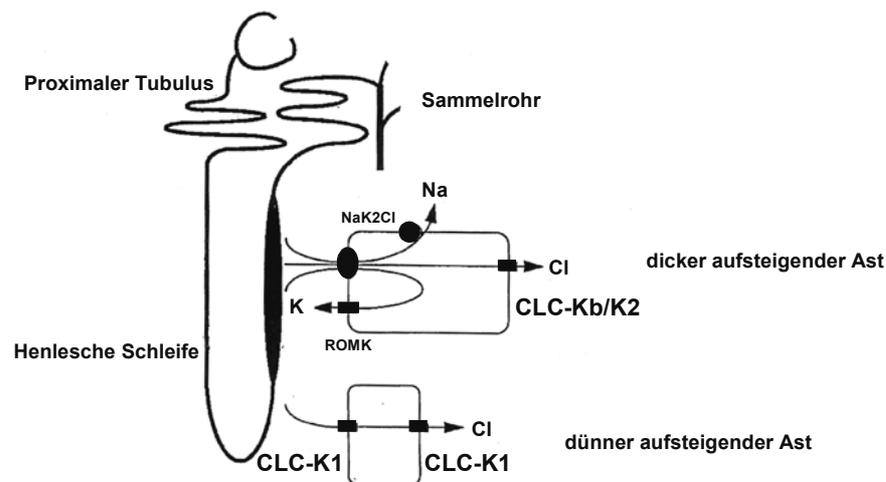


Abbildung 7: Die physiologische Rolle von CLC-K1 und CLC-Kb/K2 im Nephron (aus Waldegger und Jentsch, 2000). Die transepitheliale Chloridresorption im dünnen aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife wird durch die basolateral und apikal lokalisierten CLC-K1-Chloridkanäle vermittelt. Die Zerstörung des CLC-K1-Gens in der Knock-out-Maus führt zu einer verminderten Chloridresorption in diesem Nephronabschnitt, wodurch die Wasserresorption behindert wird und die Tiere Diabetes insipidus entwickeln. Im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife wird die Chloridresorption an der apikalen Membran von dem  $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+ \text{-} 2\text{Cl}^-$ -Kotransporter (NaK2Cl) vermittelt. Kalium wird durch den Kaliumkanal ROMK an der apikalen Membran zurücktransportiert, wohingegen Chlorid die Zelle basolateral durch CLC-Kb/K2-Kanäle verlässt. Störungen in einem der drei Transportsysteme führen zu der Erbkrankheit „Bartter-Syndrom“.

Außerdem ist bekannt, dass die Protein-Expression von CLC-K1 entwicklungsabhängig ist (Kobayashi *et al.*, 2001). Das bedeutet, dass die Protein-Expression von CLC-K1 wie die Fähigkeit zur Urinkonzentrierung mit zunehmendem Alter der Ratten gesteigert wird.

CLC-K2 zeigt ein breites Expressionsmuster innerhalb der Niere (Vandewalle *et al.*, 1997; Winters *et al.*, 1997; Yoshikawa *et al.*, 1999). Besonders stark ist CLC-K2 im distalen Tubulus und im kortikalen Teil des Sammelrohres exprimiert, etwas weniger stark im medullären Teil des dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife. Im kortikalen Teil des dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife und des medullären Teils des Sammelrohres ist CLC-K2 nur sehr schwach exprimiert. Mutationen im Gen des CLC-Kb verursachen beim Menschen das Bartter-Syndrom (Simon *et al.*, 1997), eine Erbkrankheit, bei der die Rückresorption von NaCl im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife nicht mehr richtig funktioniert (siehe Abbildung 7). Diese Erkrankung kann auch durch Mutationen in dem apikalen Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-Kotransporter oder dem Kaliumkanal ROMK verursacht werden (Simon *et al.*, 1996a; Simon *et al.*, 1996b). Charakteristische Symptome des Bartter-Syndroms sind Hypokaliämie, Dehydratation und ein gesteigertes Harnvolumen.

### **Die Chloridkanäle CLC-3, CLC-4 und CLC-5**

Innerhalb dieses Zweiges der CLC-Familie sind die Chloridkanäle CLC-3 (Kawasaki *et al.*, 1994), CLC-4 (Van Slegtenhorst *et al.*, 1994) und CLC-5 (Fisher *et al.*, 1994; Steinmeyer *et al.*, 1995) zu ungefähr 80% identisch und zeigen eine unterschiedliche Gewebeverteilung. CLC-3 und CLC-4 werden in vielen Geweben exprimiert (Kawasaki *et al.*, 1994; Jentsch *et al.*, 1999), CLC-5 hingegen hauptsächlich in der Niere (Fisher *et al.*, 1994; Steinmeyer *et al.*, 1995).

CLC-3 wird im Vorhof und in der Kammer des Herzens exprimiert (Britton *et al.*, 2000). Bezüglich der Funktion von CLC-3 gibt es unterschiedliche Meinungen. Einige Arbeitsgruppen haben Plasmamembran-Ströme in *Xenopus*-Oozyten (Kawasaki *et al.*, 1994) oder in transfizierten Zellen (Kawasaki *et al.*, 1995; Duan *et al.*, 1997; Shimada *et al.*, 2000) beobachtet. Außerdem wurde CLC-3 auch als Kandidat für den schwellungsaktivierten Chloridstrom  $I_{Cl,swell}$  vorgeschlagen (Duan *et al.*, 1997). Kürzlich ist mit Hilfe einer CLC-3 Knock-out-Maus gezeigt worden, dass CLC-3 in endosomalen Kompartimenten und synaptischen Vesikeln von Neuronen vorkommt (Stobrawa *et al.*, 2001). Die Ansäuerung der synaptischen Vesikel ist bei den Tieren beeinträchtigt, und sie leiden unter einer schweren postnatalen Degeneration der Retina und des Hippocampus. Die schwellungsaktivierten Ströme sind hierbei unverändert.

Die Expression von CLC-4 in *Xenopus*-Oozyten und Säugetierzellen induziert auswärts-rectifizierende Ströme. Man findet eine große Ähnlichkeit mit CLC-5 in vielen Eigenschaften,

## Einleitung

wie zum Beispiel der Ionenselektivität und der pH-Sensitivität (Friedrich *et al.*, 1999). Die physiologische Rolle von CLC-4 ist bisher nicht bekannt. Mäuse, die durch Züchtung kein CLC-4-Gen mehr besitzen, zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp (Adler *et al.*, 1997).

Die Expression von CLC-5 in *Xenopus*-Oozyten und Säugetierzellen (Steinmeyer *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 1999) verursacht stark auswärtsrektifizierende Chloridströme, die erst in einem Spannungsbereich höher als +20 mV gemessen werden können. Mutationen in diesem Chloridkanal führen zu einer X-Chomosom-gekoppelten Erbkrankheit, der „Dent’schen Krankheit“ (Lloyd *et al.*, 1996; Morimoto *et al.*, 1998). Die charakteristischen Symptome der Dent’schen Krankheit (Scheinman, 1998) sind Proteinurie (Ausscheidung vorwiegend niedermolekularer Proteine) und Hyperkalziurie (gesteigerte Kalziumausscheidung). Die Hyperkalziurie führt zu sekundären Symptomen, die den klinischen Phänotyp dominieren, wie zum Beispiel zu Nierensteinen und Nephrokalzinose, was wiederum ein Nierenversagen zur Folge haben kann. Der selektive Verlust niedermolekularer Proteine deutet auf einen Defekt im proximalen Tubulus hin, wo diese normalerweise durch Endozytose resorbiert werden.

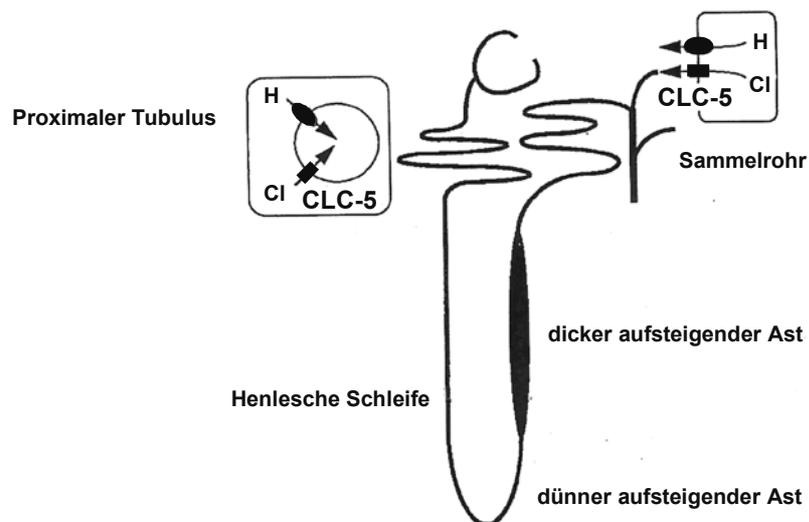


Abbildung 8: Die physiologische Rolle von CLC-5 im Nephron (aus Waldegger und Jentsch, 2000). Im proximalen Tubulus ist CLC-5 zusammen mit der Protonen-ATPase in subapikalen Endosomen lokalisiert. Im Sammelrohr kommt CLC-5 zusammen mit der Protonen-ATPase in der apikalen Membran von Säure-sezernierenden Zellen, den so genannten  $\alpha$ -Zwischenzellen, vor. In beiden Fällen könnten die durch CLC-5 erzeugten Chloridströme die positive Ladung, die während der Ansäuerung durch die Protonen-ATPase entsteht, neutralisieren. Eine gestörte endosomale Ansäuerung durch einen Funktionsverlust von CLC-5 erklärt die Proteinurie, die bei der Dent’schen Krankheit beobachtet wird.

Tatsächlich findet man CLC-5 in den subapikalen Endosomen des proximalen Tubulus (siehe Abbildung 8), wo er zusammen mit der Protonen-ATPase lokalisiert ist (Günther *et al.*, 1998; Luyckx *et al.*, 1998; Devuyst *et al.*, 1999). Die Generierung einer Knock-out-Maus (Piwon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000) hat die wichtige Rolle von CLC-5 bei der Endozytose im proximalen Tubulus bestätigt. CLC-5 ist der erste intrazelluläre Chloridkanal, dessen Bedeutung bei der Ansäuerung intrazellulärer Vesikel gezeigt werden konnte. Die Mäuse entwickeln wie der Mensch eine Proteinurie durch eine verminderte apikale Endozytose im proximalen Tubulus. Die Bildung von Nierensteinen wird nicht beobachtet.

### **Die Chloridkanäle CLC-6 und CLC-7**

Die beiden Chloridkanäle CLC-6 und CLC-7 sind nur zu 30% identisch mit den anderen Mitgliedern der Familie und werden in fast allen Geweben exprimiert (Brandt und Jentsch, 1995). CLC-6 ist wahrscheinlich in intrazellulären Organellen lokalisiert (Buyse *et al.*, 1998; Kida *et al.*, 2001), was auch erklären würde, warum bisher keine Chloridströme dieses Kanals in verschiedenen Expressionssystemen gemessen werden konnten. Die physiologische Funktion dieses Kanals ist bisher nicht bekannt.

Die Herstellung einer Knock-out-Maus hat kürzlich gezeigt, dass CLC-7 ein endosomaler und lysosomaler Chloridkanal ist, der sehr stark in Osteoklasten exprimiert wird (Kornak *et al.*, 2001). Die Zerstörung des CLC-7 in der Maus führt zu Osteopetrose, da die Osteoklasten keine Säure mehr sezernieren können. Außerdem entwickeln die Mäuse eine Degeneration der Retina. Die Osteopetrose (Marmor Knochenkrankheit) ist eine Erbkrankheit, die bereits im frühen Säuglingsalter auftreten kann und durch Symptome wie Knochenschmerzen, Spontanfrakturen bis hin zu einer Knochenmarksdysfunktion gefolgt von Anämie, Erblindung und Schwerhörigkeit charakterisiert wird. Diese Krankheit kann auch beim Menschen durch eine Mutation im Gen des CLC-7 ausgelöst werden (Kornak *et al.*, 2001). Die physiologische Funktion von CLC-7 in anderen Organen ist bisher nicht bekannt.

### **Die Bedeutung von Chloridströmen in Herz und Niere**

Chloridströme spielen sowohl im Herzen als auch in der Niere eine bedeutende Rolle. Für die meisten nativen Chloridströme sind die zugrundeliegenden molekularen Strukturen der Kanäle nicht bekannt. Eine Vielfalt von Chloridströmen kann in Herzzellen gemessen werden (Sorota, 1999). Sie sind für unterschiedliche Funktionen der Zelle und der intrazellulären Organellen verantwortlich, wie zum Beispiel für die Regulation des pH-Wertes, des Volumens und der elektrischen Aktivität. Die am besten charakterisierten Chloridströme sind der cAMP- und Proteinkinase-A-abhängige Strom ( $I_{Cl,PKA}$ ), der Kalzium-aktivierte Strom ( $I_{Cl,Ca}$ ) und der schwellungsinduzierte Strom ( $I_{Cl,swell}$ ). Diese werden in den unterschiedlichsten Zelltypen und

Regionen des Herzens generiert. Verantwortlich für die Generierung des  $I_{Cl,PKA}$  ist eine Isoform des epithelialen CFTR-Chloridkanals. Es gab eine Vielzahl von molekularen Kandidaten für  $I_{Cl,Ca}$  und  $I_{Cl,swell}$  (Okada, 1997; Pauli *et al.*, 2000), darunter auch CLC-2 und CLC-3. Sie wurden jedoch kontrovers diskutiert und nicht allgemein als verantwortliche Gene akzeptiert. Fünf Mitglieder der CLC-Chloridkanal-Familie werden im Herzen exprimiert. Das heißt, in dieser Familie gibt es eine große Anzahl von Kandidaten, die für die bereits beschriebenen Chloridströme verantwortlich sein könnten. Auch im Zusammenhang mit kardiovaskulären Krankheiten wird über Chloridströme berichtet. So wurde zum Beispiel im Herzen von Ratten mit Hypertrophie die Zunahme eines auswärtsrektifizierenden Chloridstromes (Bénitah *et al.*, 1997) und im Herzen von Hunden mit Herzinsuffizienz die Aktivierung eines schwellungsinduzierten Chloridstromes (Clemo *et al.*, 1999) beobachtet. Die verantwortlichen Gene sind bisher nicht bekannt.

In der Niere sind überall Chloridkanäle in der Plasmamembran und in intrazellulären Organellen von Zellen zu finden. Dort spielen sie, wie erwähnt, eine Rolle bei der Salz- und Wasserresorption, der Regulation des Zellvolumens, der Ansäuerung des Urins und der Ansäuerung intrazellulärer Organellen. Es gibt mehrere Chloridkanäle mit unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften in verschiedenen Zelltypen des Tubulus (Reeves und Andreoli, 1992). Acht Mitglieder der CLC-Chloridkanal-Familie werden in der Niere exprimiert. Da die Salzresorption in der Niere eine Rolle bei der Regulation des extrazellulären Volumens und des Flüssigkeitsgehaltes im Körper spielt, könnten die Chloridkanäle auch in die Regulation des Blutdruckes involviert sein.

Aufgrund der noch nicht vollständig geklärten physiologischen und pathophysiologischen Funktionen der CLC-Chloridkanäle und ihrem Vorkommen in Herz und Niere ist es interessant, ihre eventuelle Bedeutung im kardiovaskulären System herauszufinden. CLC-Chloridkanäle könnten deshalb Zielmoleküle für neue Arzneistoffe sein.

### **Die Pharmakologie kardialer Chloridkanäle**

Das Potential der Chloridkanäle als therapeutische Zielmoleküle bei kardiovaskulären Erkrankungen hat die Suche nach Modulatoren für Chloridkanäle, entweder als potentielle pharmakologische Verbindungen oder als Hilfsmittel zur molekularen und funktionellen Charakterisierung, verstärkt. Die Mehrheit der bisher veröffentlichten Studien beinhaltet als Substanzen Anthranilsäurederivate (zum Beispiel NPPB, 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoesäure), Stilbendisulfonate (zum Beispiel DIDS, 4,4'-diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonat) und den Östrogenantagonisten Tamoxifen. Ihr Nutzen ist jedoch aufgrund ihrer geringen Affinität und damit auch ihrer unspezifischen Wirkung stark eingeschränkt (Mulvaney *et al.*, 2000).

### **1.3 Tiermodelle für Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems**

Tiere können die gleichen Krankheitsbilder und Symptome wie der Mensch entwickeln, wie zum Beispiel Bluthochdruck, kardiale Hypertrophie, Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen. Deshalb werden Tiermodelle in der Forschung sehr häufig eingesetzt, um die Regulation bestimmter Gene oder Proteine zu beobachten oder um neue Substanzen zu testen.

Die Ratte ist eines der am häufigsten benutzten Versuchstiere und gilt als das am besten funktionell charakterisierte Modellsystem. Es bietet einzigartige Vorteile, menschliche Krankheiten nachzuahmen, neue therapeutische Substanzen zu entwickeln und Reaktionen auf Umwelteinflüsse zu studieren. Die Größe der Ratte ist ideal für viele physiologische Manipulationen (The Laboratory Rat, 1999). Zum Teil entstehen die Krankheiten aufgrund eines genetischen Defektes in den Tieren, der meistens durch Züchtung noch verstärkt wird. Eine weitere Möglichkeit ist es, die Blutzufuhr zu wichtigen Organen operativ zu unterbrechen und damit die Krankheit zu induzieren, wie zum Beispiel eine Herz- oder Niereninsuffizienz.

#### **Die Wistar-Kyoto-Ratte (WKY)**

Die Wistar-Kyoto-Ratte (WKY) wird häufig als Kontroll- oder Versuchstier, zum Beispiel beim Niereninsuffizienz-Modell, eingesetzt. Bei der Wistar-Ratte (*Rattus norvegicus* var. *albinos*) handelt es sich um die Albinoförm der braunen Ratte (*Rattus norvegicus*). Nach Selektion der Albinoförm sind diese Ratten von Helen Dean King ab 1909 am Wistar-Institut in Philadelphia gezüchtet worden. Die normotensive WKY-Ratte erreicht ein durchschnittliches Alter von 2,5 bis 3 Jahren.

#### **Die spontan hypertensive Ratte (SHR)**

Die spontan hypertensive Ratte (SHR), durch selektive Zucht aus Wistar-Ratten entstanden, ist das am häufigsten benutzte Tiermodell, um Komplikationen im Herz-Kreislauf-System bei Bluthochdruck zu untersuchen. Die Tiere entwickeln spontan einen langanhaltenden Bluthochdruck (systolischer Blutdruck über 150 mmHg), der Ähnlichkeiten mit dem essentiellen Bluthochdruck des Menschen hat (Trippodo *et al.*, 1981). SHR sterben im Alter von ungefähr 15 Monaten nach einer langen Periode einer stabilen, kompensierenden Hypertrophie von Herz und Arterien als Folge des ständigen Bluthochdruckes. Die wichtigsten kardiovaskulären Komplikationen sind ventrikuläre Fibrillationen aufgrund mehrerer Mikroinfarkte und Herzinsuffizienz (Pfeffer *et al.*, 1979a). Außerdem entwickeln SHR Nierenschäden, die an die Nephropathie beim Patienten erinnern (Feld *et al.*, 1990).

### **Die SH-stroke-prone-Ratte (SHR-SP)**

Maligne Hypertonie führt zu strukturellen und funktionellen Veränderungen im Herz-Kreislauf-System, verbunden mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität (Pitt *et al.*, 1992). Die aus der SHR abgeleitete SH-stroke-prone-Ratte (SHR-SP) ist ein experimentelles Tiermodell für malignen Bluthochdruck. Der systolische Blutdruck der SHR-SP steigert sich signifikant innerhalb der ersten Lebensmonate und erreicht seinen Höhepunkt nach 12 Monaten bei bis zu 230 mmHg. Das Herzgewicht und das Hydroxyprolin/Prolin-Verhältnis, ein Maß für die Fibrose, sind signifikant erhöht (Linz *et al.*, 1997; Linz *et al.*, 1998). Die Tiere leiden an schweren Herz-, Nieren- und Gehirnschäden und sterben im Alter von 9 bis 15 Monaten an einem Schlaganfall (Okamoto *et al.*, 1974; Okamoto *et al.*, 1975). Dieselben Komplikationen können auch bei Hochrisiko-Patienten mit langanhaltendem Bluthochdruck beobachtet werden (National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee, 1997). Die Nieren der Ratten zeigen eine Arterienwandhypertrophie, eine arterielle fibrinoide Nekrose und Verletzungen des Glomerulus und der tubulären Zwischenräume. Die histomorphologischen Veränderungen in den Nieren sind vor allem ein Ergebnis der chronischen Druckbelastung. Die fibrinoiden Nekrosen, die in den Arterien und in den Glomeruli gefunden werden, entsprechen der dekompensierenden durch Bluthochdruck induzierten Nephrosklerose im Menschen (Linz *et al.*, 1998).

### **Die salz-sensitive und die salz-resistente Dahl-Ratte**

Die salz-sensitiven Dahl-Ratten entwickeln nach Zugabe von 4-8% Salz zum Futter einen Bluthochdruck von ca. 180 mmHg und eine Hypertrophie des Herzens (Dahl *et al.*, 1967; Pfeffer *et al.*, 1984; Inoko *et al.*, 1994). Sie leiden außerdem an glomerulärer Sklerose und Nekrose und einem unterdrückten Renin-Angiotensin-System (Jaffe *et al.*, 1970; Rapp *et al.*, 1980). Im Gegensatz dazu bleiben salz-resistente Dahl-Ratten normotensiv und entwickeln keine Herzhypertrophie. Die Ursache für die Entstehung des Bluthochdruckes bei salz-sensitiven Dahl-Ratten könnte eine erhöhte Chlorid-Rückresorption in der Henleschen Schleife sein, die bereits vor der Salzzugabe zum Futter vorhanden ist (Roman *et al.*, 1991; Kirchner *et al.*, 1992).

### **Das Aortic-Banding-Modell in der Ratte**

Nach dem Abklemmen der abdominalen Aorta (Aortic-Banding, siehe Abschnitt 2.3.3) entwickeln die Ratten einen Bluthochdruck mit hohen Reninspiegeln, kardialer Hypertrophie und Fibrose. Der Abfall des renalen Blutdruckes führt zu einer gesteigerten Freisetzung von Renin und damit zu einer erhöhten Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Bereits sechs Wochen nach der Operation sind der erhöhte Blutdruck und die kardiale Hypertrophie deutlich zu erkennen. Als Marker für diesen Zustand sind eine Erhöhung der

Plasmaspiegel und der mRNA-Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) (Ogawa *et al.*, 1996), und eine Erniedrigung der mRNA-Expression der  $\alpha_2$ -Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und von Angiotensinogen (Ogawa *et al.*, 1998) zu beobachten.

### **Das Herzinsuffizienz-Modell in der Ratte**

Strukturelle und funktionelle Veränderungen („Remodeling“) in den Ventrikeln sind nach einem Herzinfarkt die wichtigste Ursache für die Herzinsuffizienz (Pfeffer und Braunwald, 1990). Die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen lassen sich mit Hilfe des Herzinsuffizienz-Modells in der Ratte untersuchen (Pfeffer *et al.*, 1979b; Goldman und Raya, 1995). Hierbei wird ein Herzinfarkt in der Ratte induziert (siehe Abschnitt 2.3.4). Die auftretenden Veränderungen in der Ratte sind denen im Patienten nach einem Herzinfarkt sehr ähnlich. Die Ratte entwickelt eine ventrikuläre Hypertrophie in der nicht vom Infarkt betroffenen Region und eine starke Abnahme der vom Infarkt betroffenen linksventrikulären Wand. Man beobachtet die klinischen Symptome einer chronischen Herzinsuffizienz, wie etwa periphere Ödeme, Dyspnoe, Lungengeräusche und eine gestörte Beweglichkeit. Außerdem sind auch in diesem Modell die Marker für die Hypertrophie verändert: man beobachtet einen Anstieg des ANP-Plasmaspiegels (Kouchi *et al.*, 2000) und eine Modifikation in der RNA-Expression der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (Semb *et al.*, 1998). Eine weitere Studie zeigte eine verminderte RNA-Expression der Kaliumkanäle Kv2.1, Kv4.2 und Kv4.3 drei Tage nach dem Infarkt in den nichtinfarzierten linksventrikulären Myozyten (Huang *et al.*, 2000).

### **Das Niereninsuffizienz-Modell in der Ratte**

Akutes Nierenversagen (ANV) kann aus mehreren pathophysiologischen Zuständen resultieren, wie zum Beispiel aus einem plötzlichen Abfall des renalen Blutflusses, aus einer schnellen Verschlechterung der glomerulären Funktion und aus toxischen oder obstruktiven Verletzungen der renalen Tubuli (Oliver *et al.* 1951; Anderson und Schrier, 1988; Hostetter und Brenner, 1988; Bonventre, 1988; Bonventre, 1993). Unter mehreren Faktoren ist eine plötzlich auftretende Ischämie die Hauptursache des ANV beim Menschen. Nach Wiederbeginn des Blutflusses zur ischämischen Niere kann sich die Nierenfunktion weiter verschlechtern. Dieser Zustand wird als „reperfusion injury“ bezeichnet (Bonventre, 1988; Bonventre, 1993). Man nimmt an, dass die Schwere des ANV sowohl von der Dauer der Ischämie als auch von dem Ausmaß des „reperfusion injury“ abhängig ist. Ischämisches ANV ist durch eine verminderte Urinausscheidung (Oligurie) charakterisiert, was auf eine verminderte glomeruläre Filtration hinweist. Paradoxerweise entwickeln sich nach der oligurischen Phase und trotz früher Anzeichen einer Erholung der Nierenfunktion eine schwere Natriurese sowie Diurese. Eine gesteigerte Ausscheidung von Salz und Wasser kann zu einem starken Volumenabfall führen und ist der Hauptfaktor für die Mortalität und Morbidität, die während dieser Zeit beobachtet

werden (Anderson und Schrier, 1988). Renale Säugetierzellen antworten auf die Ischämie, indem sie eine Reihe von Proto-Onkogenen und Wachstumsfaktoren induzieren (Klausner *et al.* 1989; Ouelette *et al.* 1990; Rosenberg und Paler, 1991; Bonventre *et al.* 1991; Ingelfinger und Dzau, 1991; Nigam und Lieberthal, 2000; Gobé *et al.* 2000). Ein daraus resultierender positiver Nutzen wurde für den Erholungsprozess vorgeschlagen (Bonventre, 1993; Rabb *et al.* 1995; Fervenza *et al.* 1996; Nigam und Lieberthal, 2000).

Es gibt eine Vielzahl von Transportern und Kanälen, deren Expression im Niereninsuffizienz-Modell der Ratte (siehe Abschnitt 2.3.5) untersucht worden ist und die eine veränderte mRNA-Expression aufweisen. So wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression von NHE-3 sehr stark sowie die von NHE-2 und NHE-4 leicht vermindert ist (Wang *et al.*, 1997a). Die RNA-Expression der  $H^+K^+$ -ATPase und von NHE-1 (Wang *et al.*, 1997a) sind hingegen im Cortex signifikant erhöht. Des Weiteren ist eine deutliche Abnahme der mRNA-Expression für den  $Na^+K^+2Cl^-$ -Kotransporter, den  $Na^+Cl^-$ -Kotransporter und die  $Na^+K^+$ -ATPase gezeigt worden (Wang *et al.*, 1997b). Die mRNA-Expression des epithelialen Natriumkanals blieb hierbei unverändert. Außerdem ist eine Verminderung der mRNA-Expression für den Kaliumkanal ROMK und für CHIF (Channel Inducing Factor, evtl. verantwortlich für die Regulation von Kaliumkanälen) beobachtet worden (Gimelreich *et al.*, 2001). Eine weitere Publikation beschreibt die Regulation des ATP-sensitiven Kaliumkanals im Niereninsuffizienz-Modell (Sgard *et al.*, 2000). Hierbei wurde eine Abnahme der mRNA-Expression für Kir4.1 sowie eine Zunahme der mRNA-Expression für Kir6.1 gezeigt. Von einigen Kanälen und Transportern wurde auch die Protein-Expression untersucht. Es zeigte sich, dass auch die Proteinmenge des NHE-3, der  $Na^+K^+$ -ATPase und des  $Na^+P_i$ -Kotransporters signifikant herabgesetzt sind, während eine Abnahme des  $Na^+K^+2Cl^-$ -Kotransporterproteins oder des  $Na^+Cl^-$ -Kotransporterproteins nur bei schwerem ANV (60 min Ischämie) erfolgte (Kwon *et al.*, 2000). Diese Veränderungen in der Protein-Expression korrelieren mit dem beobachteten Verlauf der mRNA-Expression. Ferner ist auch eine Verminderung der Proteinmenge der Wasserkanäle Aquaporin-1, Aquaporin-2 und Aquaporin-3 beobachtet worden (Kwon *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000).

Um die molekularen Mechanismen der Niere zu verstehen, soll kurz auf deren Anatomie und Physiologie eingegangen werden (The Laboratory Rat, 1999). Die Niere wird in Nierenrinde (Cortex) und Nierenmark (Medulla) eingeteilt. Die funktionellen Einheiten sind die Nephrone, wovon jede Rattenniere ca. 40000 besitzt. Ein einzelnes Nephron besteht aus Glomerulus (Nierenkörperchen), Tubulus (Nierenkanälchen) und Sammelrohr. Die Glomeruli halten Zellen und Proteine aus dem Blut zurück und leiten den Primärharn an die Tubuli weiter. In den Tubuli findet die Rückresorption, Sekretion und Konzentrierung des Urins statt, um den Endharn zu

produzieren, dessen Volumen weniger als 1% des Primärharns beträgt. Der Tubulus wird in mehrere Abschnitte unterteilt: in den proximalen Tubulus, die Henlesche Schleife und den distalen Tubulus. Der proximale Tubulus (PT) resorbiert zwei Drittel der tubulären Flüssigkeit und der Elektrolyte und fast alle organischen Komponenten wie Glukose und Aminosäuren. Auf der luminalen Seite des PT befinden sich in der Plasmamembran des Bürstensaumes mehrere Transportsysteme, wie zum Beispiel der  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher (NHE-3), der  $\text{Na}^+\text{-P}_T$ , der  $\text{Na}^+$ -Glukose- oder der  $\text{Na}^+$ -Aminosäuren-Kotransporter. Die ubiquitär verteilte  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase ist auf der basolateralen Seite des Epithels lokalisiert. Sie pumpt  $\text{Na}^+$  im Austausch gegen  $\text{K}^+$  aus der Zelle in den peritubulären Raum mit einem Verhältnis von 3  $\text{Na}^+$  gegen 2  $\text{K}^+$ . Die apikale und basolaterale Membran beinhalten außerdem eine große Menge des Wasserkanals Aquaporin-1. Die Henlesche Schleife besteht aus einem dünnen absteigenden, einem dünnen aufsteigenden und einem dicken aufsteigenden Teil. Hier werden 25-30% des NaCl resorbiert, vor allem im dicken Teil des aufsteigenden Astes. Die Trennung der NaCl- und Wasserbewegung ist der wesentliche Teil des so genannten Gegenstromprinzips. Das heißt, das Wasser wird im absteigenden dünnen Teil der Henleschen Schleife resorbiert (Aquaporin-1) und die Resorption von NaCl erfolgt in dem für Wasser wenig permeablen dicken Teil des aufsteigenden Astes (hauptsächlich durch den  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter). Die Feineinstellung der Harnzusammenstellung findet im distalen Tubulus und im Sammelrohr statt. Im distalen Tubulus werden 5-8% des NaCl mit Hilfe des  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -Kotransporters resorbiert. Im Sammelrohr befinden sich u. a. luminale  $\text{Na}^+$ -Kanäle (ENaC, Epipithelial Na<sup>+</sup> Channel), apikale und basolaterale Kaliumkanäle und Wasserkanäle (vor allem Aquaporin-2). Einige Hormone, wie Aldosteron, ANP und das antidiuretische Hormon (ADH), regulieren die  $\text{Na}^+$ - und Wasserresorption.

### **Das Rapid-Pacing-Modell im Kaninchen (Vorhofflimmern)**

Das Vorhofflimmern (atriale Fibrillation, AF) ist durch eine verkürzte Aktionspotentialdauer und eine verkürzte atriale Refraktärzeit charakterisiert. Es führt zu Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften der Vorhöfe, welche das Auftreten und den Erhalt dieser Rhythmusstörung begünstigen (Wijfels *et al.*, 1995). Dieser Prozess wird als „atriales Remodeling“ bezeichnet und ist sowohl im Menschen als auch in verschiedenen Tiermodellen beschrieben (Bosch *et al.*, 2000). In Zellen von Patienten mit AF und im „Rapid-Pacing-Tiermodell der AF“ (zum Beispiel am Hund) wurden die elektrophysiologischen Veränderungen charakterisiert. Sowohl beim Patienten als auch im Tiermodell wurde eine Abnahme des L-Typ-Kalziumstromes  $I_{\text{Ca,L}}$  und des transienten Auswärtsstromes  $I_{\text{to}}$  beobachtet, während es widersprüchliche Berichte über eine Abnahme der Stromdichte des Kaliumstromes  $I_{\text{kur}}$  gibt (Van Wagoner *et al.*, 1997; Bosch *et al.*, 1999; Yue *et al.*, 1997). Ferner fand sich eine Steigerung der Stromdichte des einwärtsrektifizierenden Kaliumstromes  $I_{\text{K1}}$  beim Patienten

(Van Wagoner *et al.*, 1997; Bosch *et al.*, 1999). Das Vorhofflimmern führt zu einer Modifikation der Genexpression des L-Typ-Kalziumkanals und von Kaliumkanälen. Hierbei ist vor allem eine Änderung der mRNA-Expression der Kaliumkanal-Untereinheiten Kv4.3, Kv1.4, Kv1.5 und IRK sowie der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kalziumkanal-Untereinheiten zu erkennen (Lai *et al.*, 1999a; Lai *et al.*, 1999b; Van Gelder *et al.*, 1999; Grammer *et al.*, 2000a; Grammer *et al.*, 2000b; Yue *et al.*, 1999).

### **1.4 Problemstellung**

Wie beschrieben spielen Ionenkanäle eine wichtige Rolle in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen des Herz-Kreislauf-Systems. Zu Beginn dieser Arbeit war die physiologische Funktion der meisten CLC-Chloridkanäle noch nicht bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe von RNA-Expressionsstudien, das heißt mit Northern Blots oder RT-PCR-Analysen, in sechs unterschiedlichen Tiermodellen eine mögliche Bedeutung der CLC-Chloridkanal-Familie bei Herz-Kreislauf-Krankheiten wie Bluthochdruck, Hypertrophie und Herz- oder Niereninsuffizienz aufzudecken. Im Falle einer veränderten Genexpression könnten diese Mitglieder der CLC-Chloridkanal-Familie dann möglicherweise als Zielmoleküle für die Entwicklung neuer Arzneimittel für Herz-Kreislauf-Erkrankungen dienen.

Außerdem sollte durch RNA-Expressionsstudien wichtiger Ionenkanäle im Herzen ein neues Tiermodell für Vorhofflimmern charakterisiert werden. Bei chronischer atrialer Fibrillation werden elektrophysiologische Veränderungen bei Kalium- und Kalziumströmen sehr rasch nach Einsetzen des Vorhofflimmerns beobachtet. Während bei langanhaltender atrialer Fibrillation eine veränderte Genexpression bereits beschrieben wurde, war noch nichts bekannt über den Zeitverlauf der transkriptionellen Veränderungen in dieser frühen Phase. Aus diesem Grund sollten mit Hilfe von RNA-Expressionsstudien die molekularen Grundlagen des frühen Vorhofflimmerns näher untersucht werden. Das Verständnis der frühen molekularen Änderungen des elektrischen Remodelings könnte zur Entwicklung neuer Therapieansätze, insbesondere zur Verhinderung des frühen Remodelings, führen. Das Modell könnte zudem als wertvolles Instrument bei der Erprobung neuer Arzneimittel für die Indikation Vorhofflimmern eingesetzt werden.

## 2 Material und Methoden

Dieses Kapitel beinhaltet eine Auflistung der verwendeten Materialien und eine Darstellung der eingesetzten Tiermodelle, einschließlich der Beschaffung, Haltung und Versorgung der Versuchstiere und der Vorgehensweise bei Operationen. Außerdem werden die zur Anwendung gekommenen molekularbiologischen Methoden erläutert.

### 2.1 Chemikalien, Enzyme, Kitsysteme

#### Bio-Rad

Agarose	Kat.-Nr. 162-0126
Bromphenolblau	Kat.-Nr. 161-0404
Ethidiumbromid	Kat.-Nr. 161-0433
Ladepuffer	Kat.-Nr. 9703448

#### BIOzym

MetaPhor-Agarose	Kat.-Nr. 850 180
------------------	------------------

#### DIFCO Laboratories

Bacto-Tryptone	Kat.-Nr. 0123-17-3
Bacto-Yeast-Extract, Hefeextrakt	Kat.-Nr. 0127-17-9
Bacto-Agar	Kat.-Nr. 0140-01

#### GibcoBRL

CIAP und entsprechende Puffer	Kat.-Nr. 18009-022
Glyzerin	Kat.-Nr. 15514-011
Oligo(dT) 12-18 Primer	Kat.-Nr. 1818-012
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol (25:24:1 v/v)	Kat.-Nr. 15593-031
RNaseOUT-Ribonuclease-Inhibitor recombinant	Kat.-Nr. 10777-019
Superscript II und entsprechende Puffer	Kat.-Nr. 18064-014
T4-DNA-Ligase und entsprechende Puffer	Kat.-Nr. 15224-017
Taq-Polymerase, recombinant und entsprechende Puffer	Kat.-Nr. 10342-020
Tris-Puffer	Kat.-Nr. 15714-025

#### Merck

EDTA	Kat.-Nr. 112029
Eisessig	Kat.-Nr. 2789
Formaldehyd 37%	Kat.-Nr. 2209
Kaliumacetat	Kat.-Nr. 104830
Kaliumchlorid (KCl)	Kat.-Nr. 105001
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Kat.-Nr. 102382
Lichrosolv-Wasser	Kat.-Nr. 115333
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O)	Kat.-Nr. 103544
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	Kat.-Nr. 105883
Natriumacetat	Kat.-Nr. 101539

#### PEBiosystems

BigDye-Terminator-Ready-Reaction-Kit	Kat.-Nr. 4303153
--------------------------------------	------------------

## Material und Methoden

---

### Qiagen

DyeEx-Spin-Kit (250)	Kat.-Nr. 63106
OneStep-RT-PCR-Kit	Kat.-Nr. 210212
QIAfilter-Plasmid-Midi-Kit (100)	Kat.-Nr. 12245
QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (250)	Kat.-Nr. 27106
QIAquick-Gel-Extraction-Kit (250)	Kat.-Nr. 28706
QIAquick-Nucleotide-Removal-Kit	Kat.-Nr. 28306
Proteinase-K	Kat.-Nr. 19133
RNeasy-Maxi-Kit (12)	Kat.-Nr. 75162
RNeasy-Midi-Kit (50)	Kat.-Nr. 75144
RNeasy-Mini-Kit (250)	Kat.-Nr. 74106
RNase-Free-DNase-Set (50)	Kat.-Nr. 79254

### Roche

Anti-Digoxigenin-AP-Fab-fragments	Kat.-Nr. 1 093 274
CDP-Star	Kat.-Nr. 1 685 627
DIG-Easy-Hyb	Kat.-Nr. 1 603 558
DIG-RNA-Labeling-Kit (SP6/T7)	Kat.-Nr. 1 175 025
DIG-Wash-and-Block-Buffer-Set	Kat.-Nr. 1 585 762
Nylon membranes, positively charged	Kat.-Nr. 1 417 240
RNA molecular weight marker II digoxigenin labelled	Kat.-Nr. 1 525 537

### Riedel-de Haën

Ethanol absolut	Kat.-Nr. 1170
Isopropanol	Kat.-Nr. 1219

### Roth

Formamid CH <sub>3</sub> NO	Kat.-Nr. 6749
-----------------------------	---------------

### SIGMA

Ampicillin	Kat.-Nr. A-9518
Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	Kat.-Nr. D-5520
Kanamycin	Kat.-Nr. K-0879
2-Mercaptoethanol	Kat.-Nr. M-1348
MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)	Kat.-Nr. M-1245
3M-Natriumacetat pH 5,2	Kat.-Nr. S-7899
Natriumchlorid (NaCl)	Kat.-Nr. S-9625
RNase-ZAP	Kat.-Nr. R-2020
SDS (Laurylsulfat)	Kat.-Nr. L-4390
20 x SSC Puffer	Kat.-Nr. S-6639
Tetracyclin	Kat.-Nr. T-8032

## 2.2 Puffer und Medien

### 2YT-Medium

16 g	Bacto-Trypton (Caseinhydrolysat)	DIFCO
10 g	Hefe-Extrakt	DIFCO
5 g	NaCl	Sigma
ad 1 l	Millipore-Wasser	

Die Bestandteile des Mediums wurden in Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

### 2YT-Agar

1 l	2YT-Medium	
15 g	Bacto-Agar	DIFCO

Bei der Herstellung von Agarplatten wurde der auf ca. 50°C abgekühlte Nährboden mit dem benötigten Antibiotikum versetzt und anschließend in Platten gegossen. Die Lagerung der ausgehärteten Agarplatten erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

### LB-Medium

10 g	Bacto-Trypton	DIFCO
5 g	Hefe-Extrakt	DIFCO
5 g	NaCl	Sigma
ad 1 l	Millipore-Wasser	

### TYM-Medium

20 g	Caseinhydrolysat	DIFCO
5 g	Hefe-Extrakt	DIFCO
5,54 g	NaCl	Sigma
2,54 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck
ad 1 l	Millipore-Wasser	

Die Medien wurden nach dem Lösen der Bestandteile in Wasser autoklaviert.

### DMPC-Wasser

1 ml	DMPC	Sigma
ad 1 l	Millipore-Wasser	

Das Wasser wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach autoklaviert (VARIOKLAV-Dampfdestillator Typ 250 T, H + P Labortechnik GmbH).

### 10 x MOPS-Puffer

41,86 g	MOPS	Sigma
4,1 g	Na-Acetat	Merck
20 ml	EDTA 0,5 M	Merck
ad 1 l	Millipore-Wasser	

Der Puffer wurde auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert.

### 10% SDS-Lösung

100 g	SDS	Sigma
ad 1 l	DMPC-Wasser	

## Material und Methoden

---

### 50 x TAE-Puffer

242 g	Tris	GibcoBRL
57,1 ml	Eisessig	Merck
100 ml	EDTA 0,5 M	Merck
ad 1 l	Millipore-Wasser	

Der Puffer wurde auf pH 8,0 eingestellt.

### TBF1-Puffer

30 mM	Kaliumacetat	Merck
50 mM	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck
100 mM	KCl	Merck
10 mM	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck
0,2 mM	EDTA	Merck
15%	Glyzerin	GibcoBRL

### TBF2-Puffer

10 mM	MOPS	Sigma
0,75 mM	CaCl <sub>2</sub>	Merck
10 mM	KCl	Merck
15%	Glyzerin	GibcoBRL

## 2.3 Tiermodelle

Folgende Rattenstämme wurden verwendet:

Wistar-Kyoto-Ratten (WKY)	Møllegaard, Svenved, Dänemark
Spontan hypertensive Ratte (SHR)	Møllegaard, Svenved, Dänemark
SHR-stroke-prone (SHR-SP)	Møllegaard, Svenved, Dänemark
Salz-sensitive und salz-resistente Dahl-Ratte	Harlan Sprague-Dawley, USA
Sprague-Dawley-Ratten	Møllegaard, Svenved, Dänemark

Die Tiere erhielten eine Diät der Firma Altromin GmbH (Nummer 1320) mit einem Natriumgehalt von 0,2% und Trinkwasser ad libitum. Sie wurden in normierten Käfigen der Größe 4 in Dreiergruppen gehalten. Der Hell-Dunkel-Zyklus betrug 12 Stunden. Nach Beendigung der Versuche wurden die Tiere mit Pentobarbital (60 mg/kg i. p.) anästhesiert, das Herz und die Nieren entnommen, diese sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Alle Untersuchungen wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

### 2.3.1 Die spontan hypertensive Ratte (SHR) und die SH-stroke-prone-Ratte

In unseren Versuchen wurden für diese beiden Tiermodelle WKY-Ratten als Kontrolltiere verwendet. Die Analyse für die SHR erfolgte im Alter von sechs Wochen oder 18 Monaten und die für die SHR-SP im Alter von drei oder neun Monaten.

### 2.3.2 Die salz-sensitive und die salz-resistente Dahl-Ratte

In unserem Versuch wurden salz-sensitive und salz-resistente Dahl-Ratten im Alter von zwei Monaten auf eine Diät mit hohem Salzgehalt (4%) gesetzt. Die Analyse der Tiere erfolgte nach drei Monaten.

### 2.3.3 Das Aortic-Banding-Modell in der Ratte

Erwachsene männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 270-280 g bekamen 12 Stunden vor der Operation kein Futter mehr. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von 200 mg/kg Hexobarbital anästhesiert. Der Bauch wurde durch einen Schnitt parallel zur Linea alba geöffnet, die abdominale Aorta oberhalb der linken renalen Arterie freigelegt und ein Seidenfaden darunter gelegt. Nach Platzierung einer Kanüle (0,9 x 40 mm) längs in der Aorta, wurden sowohl Aorta als auch Kanüle durch den Faden

zusammengeschnürt. Anschließend erfolgte das Entfernen der Kanüle, so dass das Lumen der Aorta den Durchmesser der Kanüle hatte. Vor der Schließung des Bauches erhielten die Tiere 5,5 mg Rolitetracyclin. Die Bauchschnitte wurden vernäht und die Fellschnitte geklammert. Die scheinoperierten Tiere unterlagen derselben Prozedur, jedoch ohne das Abschnüren der Aorta. Während der ersten fünf Tage nach der Operation erhielten die Tiere Rolitetracyclin (1 g/350 ml) über das Trinkwasser. Der Versuch war nach zwei oder sechs Wochen beendet; die Organe der Tiere wurden für die Analyse verwendet.

### **2.3.4 Das Herzinsuffizienz-Modell in der Ratte**

Männliche SHR im Alter von 16 Wochen mit einem Körpergewicht von 250-300 g wurden mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (35 mg/kg) und Xylazin (2 mg/kg) anästhesiert und mechanisch beatmet. Nach Öffnung des Perikards mittels einer linksseitigen Thorakotomie wurde die linke Koronararterie 2 bis 3 mm distal ihres Ursprungs aus der Aorta abgeklemmt. Es folgte das Vernähen der Bauchschnitte und das Klammern der Fellschnitte. Die Scheinoperation wurde nach derselben Prozedur mit Ausnahme des Abklemmens durchgeführt. Während der ersten drei Tage nach der Operation erhielten die Tiere Oxytetracyclin (200 mg/l) über das Trinkwasser (Itter *et al.*, 1998). Nach sechs Wochen war der Versuch abgeschlossen, und die Organe wurden analysiert.

### **2.3.5 Das Niereninsuffizienz-Modell in der Ratte**

Dieses Tiermodell wurde mit männlichen WKY-Ratten mit einem Körpergewicht von 250-300 g durchgeführt. Ungefähr 16 Stunden vor dem operativen Eingriff bekamen die Tiere kein Futter mehr. Die Anästhesie der Tiere erfolgte mit einer Kombination aus Xylazin (5 mg/kg Körpergewicht) und Ketamin (110 mg/kg Körpergewicht). Durch einen rechten und linken Flankenschnitt gelangte man zu den Nieren, und nach Freipräparation der Gefäße wurden die Nierenvenen und -arterien mittels Gefäßklammern verschlossen. Die Ischämie wurde nach 40 min durch das Entfernen der Klammern beendet. Sofort mit Beginn der Reperfusion wurde über 30 min die Vehikellösung (6,25 ml/kg Körpergewicht) bzw. die darin gelöste Substanz S3226 (20 mg in 6,25 ml/kg Körpergewicht) über eine Kanüle in der Schwanzvene appliziert. Nach Beendigung der Infusion folgte das Vernähen der Bauchdeckenschnitte und das Klammern der Fellschnitte. Die Durchführung der Scheinoperation erfolgte nach derselben Prozedur mit Ausnahme des Abklemmens der Gefäße. Eine Gruppe wurde mit S3226 behandelt. Bei der Substanz S3226 handelt es sich um ein Bismethacryloyl-Guanidinderivat (3-[2-(3-Guanidino-2-methyl-3-oxo-propenyl)-5-methylphenyl]-N-isopropyliden-2-methyl-acrylamidihydrochlorid).

## Material und Methoden

---

Nach 24 Stunden und am Ende des Versuches erfolgte eine Blutabnahme bei den Tieren und die Bestimmung der Kreatinin- und Harnstoffspiegel. Nach 8 Stunden bzw. 24 Stunden, 32 Stunden, 7 oder 14 Tagen wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet. In diesem Versuch wurden den Tieren nur die Nieren entnommen und diese dann mit Hilfe eines Skalpells in Medulla und Cortex aufgetrennt. Anschließend wurden die Nieren in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Das Studiendesign sah folgendermaßen aus:

Studie I	20 Tiere
2 Gruppen:	Scheinoperierte und niereninsuffiziente Tiere
4 Zeitabschnitte:	8, 24, 32 Stunden und 7 Tage nach Operation

Studie II	41 Tiere
3 Gruppen:	Scheinoperierte, Placebo-behandelte und S3226-behandelte niereninsuffiziente Tiere
5 Zeitabschnitte:	8, 24, 32 Stunden und 7 bzw. 14 Tage nach Operation

### 2.3.6 Das Rapid-Pacing-Modell im Kaninchen

Nachdem bei einem weiblichen Kaninchen (New Zealand) am Vortag der Hals- und der obere Thoraxbereich rasiert worden war, wurde das Tier mit Ketamin (70 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg i.m.) anästhesiert und in Kopftieflage gelagert. Sauerstoff wurde über eine Nasensonde zugeführt und ein Oberflächen-EKG angelegt. Nach Freipräparation der linken Vena jugularis externa wurde die Vene 2-fach umschlungen und eine Splitkanüle über eine kleine Inzision in die Vene eingeführt. Nun wurde die Stimulationselektrode durch die Splitkanüle unter Durchleuchtung vorgeschoben, wobei folgender Weg beschriftet wurde: über die Vena jugularis externa, die Vena cava superior sinistra und den Sinus coronarius zum rechten Vorhof. Durch geschicktes Platzieren der Elektrode im rechten Vorhof wurden eine gute Stimulationsreizschwelle und eine gute intraatriale Amplitude erreicht. Es folgte die Entfernung der Splitkanüle, die Ligatur der Vena jugularis und die Fixierung der Elektrode in der Subkutis. Dann erfolgte die Schließung der Wunde. Am nächsten Tag wurde mit der Stimulation mittels Schrittmacher (600 bpm, 4,5 V, 2 ms) begonnen. Aufgrund der schnellen Stimulation von 600 bpm spricht man vom „Rapid-Pacing-Modell“.

## Material und Methoden

---

Das Studiendesign sah folgendermaßen aus:

Studie mit	24 Tieren
Gruppe:	stimulierte Tiere mit eingesetzter Schrittmacherelektrode
5 Zeitabschnitte:	0 (scheinoperiert), 6, 12, 24 und 96 Stunden nach Operation

Die Aufnahme der Ionenströme geschah mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in einzelnen isolierten Myozyten des rechten Vorhofes.

### **2.4 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien**

Die Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien erfolgte mit Hilfe zweier Methoden: Transformation durch Hitzeschock oder durch Elektroporation. Als Bakterienstamm wurde XL1-Blue (Stratagene), ein Abkömmling des *E. coli*-Sicherheitsstammes K12 verwendet (Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB laq<sup>f</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>*). Bei der Herstellung kompetenter Bakterien und bei der Transformation kamen autoklavierte bzw. sterile Materialien und Reagenzien zum Einsatz.

#### **2.4.1 Hitzeschock**

Zur Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien wurde eine XL1-Blue-Stammlösung auf einer 2YT-Agarplatte (10 mg/l Tetracyclin, Sigma) ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert (Heraeus, Typ B5028). Anschließend wurden 50 ml TYM-Medium (10 mg/l Tetracyclin) mit einer Einzelkolonie XL1-Blue-Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm (Inkubator Braun Certomat HK) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 150 ml Medium mit 5 ml der Vorkultur angeimpft und weitere drei Stunden inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 erreicht war. Es folgten eine Kühlung der Bakterienkultur für 2 min auf Eis, eine gleichmäßige Verteilung auf vier kalte Röhrchen und eine Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm und 4°C (Sorvall Standzentrifuge RC-5B, Rotor SS-34). Der Überstand wurde verworfen. Die Bakteriensedimente wurden jeweils in 10 ml kaltem TBF1-Puffer resuspendiert, jeweils zwei Röhrchen vereint und 8 min zentrifugiert. Schließlich wurden die Bakteriensedimente in 2,4 ml TBF2-Puffer resuspendiert, in 50 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die Hitzeschock-kompetenten Bakterien wurden zusammen mit 3 µl Ligierungsansatz (siehe Abschnitt 2.8.2) oder 1-5 ng Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 45 s in einem Wasserbad bei 42°C erwärmt (Hitzeschock). Danach folgte die Abkühlung der Bakterien für 2 min auf Eis und das Schütteln für 30 min in 1 ml 2YT-Medium bei 37°C. Von dieser

Suspension wurden 100  $\mu$ l (Plasmid-DNA) bis 300  $\mu$ l (Ligierungsansatz) auf 2YT-Agarplatten (200 mg/l Ampicillin, Sigma) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.4.2 Elektroporation**

Zur Herstellung elektrokompenter Bakterien wurden 10 ml LB-Medium (10 mg/l Tetracyclin) mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde 1 l LB-Medium angeimpft und 3-5 Stunden inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 erreicht worden war. Die Kultur wurde in vorgekühlte Zentrifugenbecher (Sorvall) überführt, 20 min auf Eis gekühlt und 10 min bei 3000 rpm und 4°C (GS3-Rotor) zentrifugiert. Nach dem vollständigen Entfernen des Überstandes wurde das Bakteriensediment in 1 l eiskühlem Wasser resuspendiert und zentrifugiert. Danach wurde das Sediment in 400 ml 10%igem Glycerin (w/v) resuspendiert und wieder zentrifugiert. Schließlich erfolgte die Aufnahme des Sedimentes in 40 ml und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in 5 ml 10%igem Glycerin. Diese Bakteriensuspension wurde in 50  $\mu$ l Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die elektrokompenten Bakterien wurden mit 1  $\mu$ l Ligierungsansatz oder mit 1 ng Plasmid-DNA bei 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  und 2,5 kV im GenePulser (BioRad) transformiert. Die Bakterien wurden in 1 ml 2YT-Medium ohne Antibiotikum suspendiert und 15 min bei 37°C geschüttelt, wovon 100  $\mu$ l bis 300  $\mu$ l auf 2YT-Agarplatten (200 mg/l Ampicillin) ausplattiert und über Nacht inkubiert wurden.

## **2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA kamen je nach gewünschter Menge zwei Methoden zur Anwendung: die Minipräparation und die Midipräparation. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde anschließend zum Beispiel bei Restriktionsanalysen, Sequenzierungen und Herstellung von nichtradioaktiven Sonden eingesetzt. Die Bestimmung der Menge bzw. der Qualität der DNA erfolgte photometrisch nach den jeweiligen Präparationen (siehe Abschnitt 2.6.4) und durch eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.6.2).

### **2.5.1 Minipräparation**

Für die Minipräparation von Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur wurde der QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (Qiagen) mit den entsprechenden Puffern verwendet. Die Gewinnung und Reinigung der Plasmid-DNA basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und einer darauffolgenden Adsorption der DNA an eine Silikatmatrix in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration (Vogelstein und Gillespie, 1979).

3 ml des mit 200 mg/l Ampicillin versetzten 2YT-Mediums wurden mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien angeimpft und über Nacht (12-14 h) bei 37°C geschüttelt. Nach Zentrifugation von 1,5 ml dieser Kultur für 1 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge (Biofuge Pico, Heraeus) wurde das Bakteriensediment in 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl P2-Puffer zugegeben, es wurde vorsichtig durch mehrmaliges Umdrehen gemischt, somit die alkalische Lyse induziert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 350 µl N3-Puffer (Neutralisierungspuffer) erfolgte nach vorsichtigem Invertieren die Fällung der genomischen DNA, von Proteinen und Zelltrümmern. Danach wurde für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit der Plasmid-DNA auf die QIAprep-Säulen pipettiert. Die Durchflussflüssigkeit wurde nach Zentrifugation für 1 min (13000 rpm) verworfen. Es folgte ein Wasch-Schritt durch Zugabe von 750 µl PE-Puffer, der 70% Ethanol enthielt, um ein Auswaschen der DNA zu verhindern. Nach einer Zentrifugation von 1 min wurde die Durchflussflüssigkeit verworfen. Eine weitere Zentrifugation für 1 min (13000 rpm) entfernte das restliche Ethanol, das eventuell auf der Säule verblieben war und nachfolgende Enzymreaktionen inhibieren würde. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl EB-Puffer in der Tischzentrifuge.

### 2.5.2 Midipräparation

Für die Midipräparation wurden der QIAfilter-Plasmid-Midi-Kit (Qiagen) und die entsprechenden Puffer verwendet. Die Adsorption der DNA an ein positiv geladenes Anionen-Austauscher-Harz findet unter speziellen Salz- und pH-Bedingungen statt. RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden durch Waschen mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration entfernt. Die Plasmid-DNA wird mit einem Puffer mit einer hohen Salzkonzentration eluiert und die Lösung anschließend durch eine Isopropanolfällung entsalzt und konzentriert.

25 ml einer über Nacht bei 37°C geschüttelten Bakterienkultur in 2YT-Medium (Ampicillin 200 mg/l) wurden 10 min bei 5000 rpm (Sorvall Standzentrifuge RC-5B, Rotor SS-34) zentrifugiert. Nachdem das Sediment in 4 ml P1-Puffer resuspendiert war, folgte die Zugabe von 4 ml P2-Puffer. Es wurde durch mehrmaliges Umdrehen gemischt und das Lysat für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Harzsäulen (Qiagen-tip 100) mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert. Der Durchfluss erfolgte hier und in den folgenden Schritten durch Gravitation. Nach der Inkubation für 5 min wurden zu dem Lysat 4 ml gekühlter P3-Puffer (Kaliumacetat, zur Neutralisierung) gegeben, wodurch bakterielle Proteine, Zelltrümmer und die genomische DNA gefällt wurden. Dann wurde wieder durch mehrmaliges vorsichtiges Umschütteln gemischt, anschließend das Lysat zum Abtrennen des Präzipitats durch eine

QIAfilter-Spritze filtriert und das Filtrat direkt auf die zuvor äquilibrierte Harzsäule appliziert. Nach zweimaligem Waschen der Harzsäule mit 10 ml QC-Puffer wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Es folgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und ein Zentrifugationsschritt für 35 min bei 4°C und 11000 rpm (Sorvall Standzentrifuge). Das DNA enthaltende Sediment wurde kurz an der Luft getrocknet, in 400 µl Wasser aufgenommen und erneut mit Ethanol, wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben, gefällt.

### **2.6 Analyse von DNA**

In diesem Abschnitt werden Methoden zur Analyse von DNA vorgestellt. Dazu gehören der Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen, die Agarose-Gelelektrophorese, die Sequenzierung und die photometrische Untersuchung von DNA.

#### **2.6.1 Restriktionsverdau von DNA**

Die zu schneidende DNA wurde mit dem jeweiligen Restriktionsenzym gemäß den Herstellerangaben (NEB oder GibcoBRL) 1–2 Stunden inkubiert. In der Regel kamen Typ-2-Endonukleasen zum Einsatz, die durch 50 mM EDTA deaktiviert, hitzeinaktiviert oder durch den QIAquick-Nucleotide-Removal-Kit (Qiagen) entfernt werden konnten. Mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.6.2) erfolgte die Analyse der geschnittenen DNA.

#### **2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA**

Die Gelelektrophorese ist die Standardmethode für die Identifizierung, Trennung und Reinigung von linearen DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA sowie für die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten (Sambrook *et al.*, 1989). Durch die Variation der Agarosekonzentration können lineare DNA-Fragmente in unterschiedlichsten Größen getrennt werden. Zur Auftrennung sehr kleiner Fragmente (zum Beispiel bei der RT-PCR) wurden Gele bis zu einer Konzentration von 3,5% mit einer speziellen Agarose (Metaphor-Agarose) hergestellt.

Die Agarose (BioRad, bis 2%) wurde in TAE-Puffer in der Mikrowelle (Micromat, AEG) aufgeköcht. Nach Abkühlung bei Raumtemperatur auf 50-60°C wurden 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben, und das Gel wurde gegossen. Nachdem die DNA-Proben mit 1/10 des Volumens an Ladepuffer (BioRad) versetzt waren, wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet, und die DNA-Proben wurden neben einem DNA-Molekulargewichtsstandard in die Taschen des Gels pipettiert. Die angelegte Spannung betrug 60-120 V für 1 bis 3 h. Die

DNA konnte durch die Interkalation des Ethidiumbromids durch UV-Anregung auf einem Transilluminator (Biometra TI1) sichtbar gemacht werden.

### 2.6.3 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977), auch Didesoxynukleotidverfahren genannt. Mittels des BigDye-Terminator-Ready-Reaction-Kits (PEBiosystems) wurden in einer enzymatischen, PCR-ähnlichen Reaktion basenspezifisch terminierte DNA-Fragmente erzeugt. Die Sequenzen wurden über eine Polyacrylamid-Gelmatrix, die sich in einer Glasfaserkapillare befand, aufgetrennt und spektroskopisch ausgewertet. Diese Kapillarsequenzierung erfolgte im ABI-PRISM-310-Genetic-Analyzer (ABI-Systems).

Der Kettenabbruch wird durch modifizierte Didesoxynukleotide herbeigeführt, die an Farbstoffe mit einem jeweils für eine Base spezifischen Emissionsspektrum gebunden sind. Wenn während der Reaktion ein Didesoxynukleotid eingebaut wird, kommt es zu einem Kettenabbruch, da durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe im Didesoxynukleotid keine Phosphodiesterbrücke zum nächsten Nukleotid ausgebildet werden kann. Die Donorfarbstoffe (Fluoresceinderivate) der veränderten Didesoxynukleotide werden durch einen Argonionenlaser angeregt. Die Energie wird auf den jeweiligen Akzeptorfarbstoff (Dichlororhodaminderivate) übertragen, der nach dieser Anregung Licht mit charakteristischer Wellenlänge emittiert.

Für die Sequenzierungs-PCR (Thermocycler, PE Biosystems) wurden als Matrizen-DNA 2 µl Miniprep- oder 0,5 µg Midiprep-Plasmid-DNA eingesetzt. Die Primer bestanden aus 22–24 Nukleotiden, endeten am 3'-Ende mit G oder C und besaßen eine optimale Schmelztemperatur von 55°C. Die Primerkonzentration betrug 0,5 µM. Außerdem wurden 4 µl des BigDye-Terminator-Reaktionsmixes und besonders gereinigtes Wasser (Lichrosolv-Wasser, Merck) ad 20 µl hinzugefügt.

Die PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

96°C für	10 sec
50°C für	5 sec
60°C für	4 min

Dieser Zyklus wurde 25 mal wiederholt. Vor dem ersten Zyklus wurde der Ansatz für 5 min auf 95 °C aufgeheizt, um sämtliche DNA zu denaturieren. Am Ende wurde die Temperatur auf 4°C verringert. Nach diesem Verfahren wurden die Kettenabbruchprodukte mit Hilfe des DyeEx-Spin-Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt. Das Eluat wurde 2 min bei 95°C

denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen, und schließlich mit dem ABI Prism 310 analysiert. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte visuell und die der Sequenzen mit Hilfe der Wisconsin-Package-Software (Version 10.1, Genetics Computer Group).

### **2.6.4 Photometrische Analyse**

Um die Konzentration und Reinheit von Nucleinsäuren zu bestimmen, wurde die Absorption einer geeigneten Verdünnung bei 260 und 280 nm mit dem Genequant II (Pharmacia Biotech) gemessen. Unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes ließ sich die Konzentration aus der Absorption und dem bekanntem Extinktionskoeffizienten berechnen, wobei die Optische Dichte von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA bzw. ~33 µg/ml einzelsträngigen Oligonukleotiden entsprach. Zur Abschätzung der Reinheit der DNA-Lösung wurde der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  (Wert für den Proteinanteil in der Lösung) herangezogen. Er sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

## **2.7 Reinigung von DNA**

In diesem Abschnitt werden drei Methoden zur Reinigung der DNA beschrieben. Diese beinhalten die Phenol-Chloroform-Extraktion, die Ethanolpräzipitation und die Elution von Nucleinsäuren aus Agarosegelen.

### **2.7.1 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Proteinkontaminationen (zum Beispiel durch Restriktionsenzyme, alkalische Phosphatase, Polymerasen etc.) lassen sich durch eine Phenol-Extraktion (Wallace, 1987) entfernen. Durch seine denaturierende Wirkung fällt Phenol Proteine, die in der Interphase zwischen wässriger DNA-Phase und der organischen Phenol-Phase angereichert werden. Der Zusatz von Chloroform stabilisiert die Phasengrenze und verstärkt den denaturierenden Effekt. Nach gründlichem Mischen von wässriger und organischer Phase wird das Erreichen der Phasentrennung durch Zentrifugation beschleunigt. Die wässrige DNA-Phase wird abgenommen, ohne denaturierte Proteine der Interphase mitzuschleppen. In der wässrigen Phase gelöstes Phenol wird anschließend mit Chloroform entfernt. In der Regel folgt eine Ethanol-Fällung (siehe Abschnitt 2.7.2), um die DNA zu konzentrieren.

Die DNA-Lösung wurde zweimal mit dem gleichen Volumen einer mit TE-Puffer gesättigten Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol(24:25:1)-Lösung (GibcoBRL) ausgeschüttelt und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Heraeus, Biofuge Pico). Nach dem Entfernen der oberen wässrigen Phase wurde mit Chloroform (GibcoBRL) ausgeschüttelt und erneut 5 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde abpipetiert und die DNA mit Ethanol gefällt (siehe Abschnitt 2.7.2).

### **2.7.2 Ethanolpräzipitation**

Die Fällung mit Ethanol ist eine Standardmethode zur Verringerung der Salzkonzentration und zur Konzentrierung der DNA. Nukleinsäuren bilden in Gegenwart einwertiger Kationen in Ethanol unlösliche Präzipitate. Diese werden zentrifugiert, gewaschen und getrocknet. Das DNA-Sediment wird anschließend in einem kleinen Volumen Wasser aufgenommen.

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 des Volumens an 3M-Natriumacetat pH 5,2 (Sigma) und dem 2,5-fachen Volumen an absolutem Ethanol (Riedel-de Haën) versetzt und gemischt. Es folgte eine Zentrifugation der gefällten DNA für mindestens 30 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur (Heraeus, Biofuge Pico). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das DNA-Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, ohne das Sediment zu resuspendieren. Der Wasch-Schritt hatte den Zweck, restliche Salze zu entfernen. Anschließend wurde 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Ethanol-Rückstände in dem DNA-Sediment wurden vollständig in der Vakuumzentrifuge (Savant, Speed Vac Plus SC 11A und Refrigerated Vapor Trap RVT 100) entfernt. Die Aufnahme des trockenen Sedimentes erfolgte in einem geeigneten Volumen Wasser.

### **2.7.3 Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen**

Zur Reinigung und Gewinnung von DNA-Fragmenten wurde ein präparatives Agarosegel hergestellt. Nach dem Ausschneiden der DNA-Bande mit einem sauberen Skalpell unter UV-Licht wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick-Gel-Extraction-Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Agarose-Stück extrahiert.

Zum Auflösen der Agarose wird chaotropischer Puffer eingesetzt, und die Nukleinsäuren binden selektiv an die Säulen mit immobilisierter Glasmilch. Verunreinigungen sowie Agarose werden von der Säule heruntergewaschen, und die DNA wird mit 30-50 µl Wasser eluiert.

## **2.8 Modifizierung von DNA**

In diesem Abschnitt wird erklärt, wie DNA modifiziert werden kann. Hierbei wird die Dephosphorylierung und die Ligierung von DNA-Fragmenten sowie die Linearisierung von Plasmid-DNA beschrieben.

### 2.8.1 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Ligierung eines Vektorfragmentes mit sich selbst zu verhindern, wird die Dephosphorylierung durchgeführt. Sind beide Enden dephosphoryliert, können sie nicht mehr kovalent miteinander verknüpft werden.

Zur Dephosphorylierung wurde der Restriktionsansatz mit dem QIAquick-Nucleotide-Removal-Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben gereinigt und daraufhin mit Dephosphorylierungspuffer (GibcoBRL) und alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIAP, GibcoBRL) für 30 min bei 37°C und für 30 min bei 50°C inkubiert. Der Ansatz bestand aus: 28 µl Eluat, 3,5 µl Dephosphorylierungspuffer, 2 µl Dilutionspuffer und 1,5 µl CIAP. Das Enzym wurde anschließend für 10 min bei 70°C inaktiviert und der Reaktionsansatz mit dem QIAquick-Nucleotide-Removal-Kit (Qiagen) gereinigt.

### 2.8.2 Ligierung von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen katalysieren die kovalente Verknüpfungen zwischen 5'-Phosphat und 3'-OH-Gruppen. Durch die Hydrolyse von ATP als energiereichem Faktor wird diese endergonische Reaktion thermodynamisch möglich. Durch das Schließen von Phosphodiesterbindungen werden DNA-Fragmente zu einem Strang bzw. Ring zusammengefügt. Die Ligierung wurde mit der T4-DNA-Ligase (GibcoBRL) durchgeführt. Diese benötigt zur vollständigen Katalyse ca. 16 h bei 16°C. Das molare Mengenverhältnis Plasmid:Insert sollte etwa 1:5 betragen. Bei einem Einsatz von anderen Mengenverhältnissen kann es zu Religierungen oder Mehrfachinsertionen kommen.

Der Ligierungsansatz war folgender:

DNA-Fragmente, in Wasser gelöst	7 µl	
T4 DNA Ligase	1 µl	GibcoBRL
5 x Ligierungspuffer	2 µl	GibcoBRL

Die Komponenten des Ansatzes wurden auf Eis pipettiert, gemischt und über Nacht im Wasserbad bei 16°C inkubiert. Die Ligierung wurde bis zur Transformation (siehe Abschnitt 2.4) bei 4°C aufbewahrt.

### 2.8.3 Linearisierung von Plasmid-DNA

Die Linearisierung wurde zur Herstellung der nichtradioaktiven RNA-Sonden benötigt. 5-10 µg Plasmid-DNA wurden in einem Restriktionsansatz geschnitten. Nach der Inkubation bei der für das Enzym optimalen Temperatur für 2-3 Stunden wurde die Vollständigkeit der Linearisierung auf einem Agarosegel (siehe Abschnitt 2.6.2) überprüft. Anschließend wurde die geschnittene

DNA nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe Abschnitt 2.7.1) einer Ethanolfällung (siehe Abschnitt 2.7.2) unterzogen und in 10 µl Wasser aufgenommen. Die Bestimmung der Endkonzentration der Lösung erfolgte photometrisch (siehe Abschnitt 2.6.4).

### **2.9 Ein-Schritt- und Zwei-Schritt-RT-PCR**

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) lassen sich spezifisch RNA-Sequenzen amplifizieren. Man kann die Genexpression auf der Stufe der RNA untersuchen, aber auch speziell die Menge von RNA bestimmen. Bei der RT-PCR wird zuerst eine cDNA-Erststrangsynthese mit Hilfe einer Reversen Transkriptase mit RNA als Matrize durchgeführt. Darauf folgt eine PCR, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient. Wird die Erststrangsynthese und die PCR in einem Schritt durchgeführt, spricht man von Ein-Schritt-RT-PCR. Wird die RT-PCR hingegen in zwei Etappen durchgeführt, so nennt man sie Zwei-Schritt-RT-PCR. Bei der cDNA-Erststrangsynthese können verschiedene Arten von Primern, die sich je nach Zielsetzung der Experimente unterscheiden, für die Polymerase-reaktion verwendet werden. Entweder nimmt man einen Oligo(dT)-Primer (15-20 bp), der im Bereich des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA hybridisiert, und mit dessen Hilfe aus der Gesamt-RNA alle mRNA-Moleküle (2-4% der Gesamt-RNA) selektiv in cDNA umgeschrieben werden. Oder man verwendet – im Falle der Ein-Schritt-RT-PCR – Gen-spezifische Primer. Diese sind von Vorteil, wenn zum Beispiel ein Transkript mit geringer Häufigkeit amplifiziert werden soll. Auf diese Weise wird schon bei der Erststrangsynthese selektiv das gewünschte Transkript in cDNA umgeschrieben und somit die Menge an möglichen Nebenprodukten bei der anschließenden Polymerasekettenreaktion verringert.

Die PCR (Saiki *et al.*, 1988) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt und dient zur Vervielfältigung der DNA. Die PCR ist eine sich wiederholende Reaktion in drei Schritten. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang durch Hitze getrennt, die so genannte Denaturierung. Es entstehen einzelsträngige DNA-Matrizenmoleküle. Danach erfolgt im zweiten Schritt die Hybridisierung der Primer (synthetische DNA-Oligonukleotide als Startermoleküle) bei niedrigerer und für die Zusammensetzung und Länge der Primer spezifischen Temperatur an die einzelsträngige DNA (Annealing). Die Synthese findet im dritten Schritt statt ausgehend vom 3'-Ende der Primer bei 72°C durch das Enzym Taq-Polymerase. Die Taq-Polymerase ist eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus*.

## Material und Methoden

### Durchführung der Zwei-Schritt-RT-PCR

SUPERSCRIPT II (GibcoBRL) wurde aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV) isoliert und ist eine RNase-H<sup>-</sup>-Reverse-Transkriptase (RT), die einen komplementären DNA-Strang ausgehend von einzelsträngiger RNA oder DNA synthetisiert. Das Enzym besitzt eine Mutation in der RNase-H-codierenden Sequenz und deshalb eine sehr geringe RNase-H-Aktivität. Der Abbau der RNA während der Erststrangsynthese wird somit verhindert. Deshalb synthetisiert die RT mehr cDNA-Moleküle, welche die vollständige Länge der mRNA abdecken, und insgesamt größere Mengen an cDNA.

Ein Reaktionsvolumen von 20 µl wurde für 1-5 µg Gesamt-RNA oder 50-500 ng mRNA benutzt. Als erster Schritt erfolgte die cDNA-Synthese mit Hilfe der Reversen Transkriptase SUPERSCRIPT II .

Folgender Reagenzien wurden pipettiert:

Oligo (dT) <sub>12-18</sub> (500 µg/ml)	1 µl	GibcoBRL
Gesamt-RNA	1-5 µg	
DMPC-Wasser	ad 12 µl	

Das Gemisch wurde für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden folgende Bestandteile zugegeben:

5 x First-Strand-Buffer	4 µl	GibcoBRL
0,1 M DTT	2 µl	GibcoBRL
10 mM dNTP-Mix	1 µl	GibcoBRL

Nun wurde vorsichtig gemischt, für 2 min bei 42°C inkubiert und zuletzt 1 µl SUPERSCRIPT II zugegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Es folgte eine Inkubation für 50 min bei 42°C und schließlich eine Inkubation für 15 min bei 70°C, um die Reaktion zu inaktivieren.

Die cDNA konnte nun als Matrize zur Amplifikation in einer PCR benutzt werden.

Nur 10% der gewonnenen cDNA wurden bei der PCR eingesetzt. Die Zugabe von größeren Mengen würde keine größere Menge an PCR-Produkten ergeben.

Folgende Reagenzien wurden pipettiert:

10 x PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl)	5 µl	GibcoBRL
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl	GibcoBRL
10 mM dNTP-Mix	1 µl	
Primer 1 (10 µM)	1 µl	
Primer 2 (10 µM)	1 µl	
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl	GibcoBRL
cDNA	2 µl	
Wasser	38,1 µl	Merck

## Material und Methoden

Die Reagenzien wurden vorsichtig gemischt, in das PCR-Gerät (T<sub>3</sub>-Thermocycler, Biometra) gestellt und zuerst 2 min bei 94°C denaturiert.

Anschließend wurde folgender Zyklus 30 mal durchgeführt:

94°C für	30 sec	Denaturierung
55°C für	30 sec	Annealing
72°C für	1 min	Synthese

Es folgte die Synthese für 10 min bei 72°C und ein Abkühlen der Reaktion auf 4°C.

### Durchführung der Ein-Schritt-RT-PCR

Der OneStep-RT-PCR-Kit (Qiagen) beinhaltet optimierte Komponenten, die sowohl eine reverse Transkription als auch eine PCR-Amplifikation in einer als „One-step“ (Ein-Schritt) bezeichneten Reaktion ermöglichen. Die Reversen Transkriptasen „Omniscrypt“ und „Sensiscrypt“ sind im OneStep-RT-PCR-Enzym-Mix enthalten und ermöglichen eine hocheffiziente und spezifische reverse Transkription. Omniscrypt wurde speziell für die reverse Transkription von RNA-Mengen über 50 ng entwickelt und Sensiscrypt für den Gebrauch bei sehr kleinen RNA-Mengen (<50 ng) optimiert. Diese spezielle Enzym-Kombination ermöglicht eine reverse Transkription von einer RNA-Menge zwischen 1 pg und 2 µg.

Außerdem ist die HotStar-Taq-DNA-Polymerase im OneStep-RT-PCR-Enzym-Mix enthalten und ermöglicht einen Heißstart („hot start“-PCR) für eine hochspezifische Amplifikation. Das bedeutet, dass die HotStar-Taq-DNA-Polymerase während der reversen Transkription komplett inaktiv ist und die Reaktion der Reversen Transkriptase nicht behindert. Nach Ablauf der reversen Transkription wird das Reaktionsgemisch für 15 min bei 95°C inkubiert. Die HotStar-Taq-DNA-Polymerase wird aktiviert und gleichzeitig findet eine Inaktivierung der Reversen Transkriptasen statt. Diese Heißstart-Prozedur vermeidet unspezifische Hybridisierungen und die Bildung von Primerdimeren.

Die benötigten Komponenten wie RNA, Primer-Lösungen, dNTP-Mix, 5 x OneStep-RT-PCR-Puffer und RNase-freies Wasser wurden aufgetaut und auf Eis gestellt.

Folgender Reagenzien wurde pipettiert:

5 x OneStep-RT-PCR-Puffer	10 µl	Qiagen
10 mM dNTP-Mix	2 µl	Qiagen
5 x Q-Solution, wenn notwendig	10 µl	Qiagen
Primer 1 (10 µM)	3 µl	
Primer 2 (10 µM)	3 µl	
QIAGEN OneStep-RT-PCR-Enzym-Mix	2 µl	Qiagen
RNA	1 pg – 2 µg	
Wasser	ad 50 µl	Qiagen

## Material und Methoden

---

Die Reagenzien wurden vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt, kurz zentrifugiert und in das PCR-Gerät (T<sub>3</sub>-Thermocycler, Biometra) gestellt.

Dieses Programm wurde gestartet:

50°C	30 min	Reverse Transkription
95°C	15 min	PCR-Aktivierung, Heißstart
94°C	30 sec	Denaturierung
Variabel	30 sec	Annealing
72°C	1 min	Synthese
72°C	10 min	Synthese

Die Annealing-Temperatur war je nach Primer zu optimieren. Nach dem letzten Zyklus erfolgte ein Abkühlen auf 4°C.

### **2.10 Isolierung von RNA aus tierischem Gewebe**

Die Isolierung von RNA aus tierischem Gewebe erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Maxi-Kits (Qiagen). Dieser Kit kommt zum Einsatz, wenn das Gewebe zwischen 0,15 und 1 g wiegt. Es gibt weitere Produkte der Firma Qiagen, mit denen kleinere Gewebemengen verarbeitet werden können (RNeasy-Midi-Kit und RNeasy-Mini-Kit). Die eingesetzten Mörser und Pistille wurden bei 240°C über Nacht erhitzt, so dass es zu keiner Kontamination mit RNasen kommen konnte. Alle zugegebenen Puffer müssen RNase-frei sein.

Die Gewebeproben werden zuerst in Gegenwart eines Puffers, der Guanidinisothiocyanat enthält, lysiert und homogenisiert. Guanidinisothiocyanat wirkt stark denaturierend, inaktiviert sofort die RNasen und gewährleistet so eine Isolierung intakter RNA. Ethanol wird zugefügt und das lysierte Gewebe wird auf die Säulen, die eine Silikatgel-Membran besitzen und die Gesamt-RNA binden, gegeben. Die restlichen Zellbestandteile werden durch Waschen entfernt. Die RNA wird mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Zuerst wurden 10 µl β-Mercaptoethanol zu 1 ml RLT-Puffer und das vierfache Volumen an absolutem Ethanol zu dem RPE-Puffer zugesetzt. Der Mörser und das Pistill wurden mit flüssigem Stickstoff gekühlt, das Gewebe gewogen und 0,5-1 g mit Hilfe des Pistills im Mörser zerkleinert. Das Gewebe wurde unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu einem sehr feinen Pulver zerstoßen. Dieses Pulver wurde in bereits gekühlte 50 ml-Falcon-Röhrchen geschüttet und in 15 ml RLT-Puffer mit Hilfe eines Ultra-Turrax-T25 (IKA, Labortechnik) homogenisiert. Das Lysat wurde 10 min bei 5000 rpm (Zentrifuge EBA 12, Hettich) zentrifugiert. Das Sediment bestand aus Zellresten; manchmal bildete sich eine Fettschicht über dem Überstand. Deshalb musste beim Abpipettieren des Überstandes vermieden werden, das Sediment oder die Fettschicht mitzuführen, da beides die Membran der Säule verstopfen könnte. Nach Zugabe von 15 ml 70%igem Ethanol zu dem abpipettierten Lysat

wurde gut gemischt und das Lysat auf die Säulen gegeben. Zur Bindung der RNA an die Säulen folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 5000 rpm und danach das Verwerfen der Durchflussflüssigkeit. Das maximale Ladevolumen der Säule betrug 15 ml, so dass dieser Vorgang 2 bis 3 mal wiederholt wurde. Nachdem die Säule mit 7,5 ml RW1-Puffer gewaschen war, wurde zentrifugiert (5 min, 5000 rpm). Anschließend erfolgte ein DNase-Verdau. Dafür wurden 30 µl Dnase-I-Stocklösung (Qiagen) mit 210 µl RDD-Puffer angesetzt. Diese Lösung wurde direkt auf die Membran der Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten die Zugabe von 7,5 ml RW1-Puffer auf die Säule und eine Inkubation von 5 min. Dann wurde 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und die Durchflussflüssigkeit verworfen. Die Säule wurde mit 10 ml RPE-Puffer gewaschen, 2 min bei 5000 rpm zentrifugiert und die Durchflussflüssigkeit wieder verworfen. Es erfolgte ein zweiter Wasch-Schritt mit 10 ml RPE-Puffer und wieder eine Zentrifugation für 10 min. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA zweimal durch 3-minütige Zentrifugation mit 80 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Skelettmuskel-, Herz- und Haut-Gewebe kann durch die Menge an kontraktilen Proteinen, Bindegewebe und Kollagen erschwert werden. Zur Entfernung dieser Proteine wurde das Standardprotokoll um einen Proteinase-Verdau-Schritt ergänzt: Nach dem Homogenisieren wurden für den Proteinase-Verdau 15 ml RNase-freies Wasser hinzugefügt. Nach Zugabe von 250 µl Proteinase-K (Qiagen) wurde der Ansatz durch Pipettieren gründlich gemischt. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei 55°C. Anschließend wurde 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Abweichend vom Standard-Protokoll fügte man anstelle von 70%igem Ethanol 11 ml absolutes Ethanol dem Lysat hinzu und mischte durch Pipettieren. Dieses Gemisch wurde auf die Säule gegeben und die RNA durch Zentrifugation an die Säule gebunden. Ab diesem Schritt waren beide Protokolle identisch.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch wie in Abschnitt 2.6.4 beschrieben. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

Gleiche Mengen von RNA einzelner Tiere wurden gemischt und als Pool bei der Northern Blot-Analyse und der RT-PCR eingesetzt. Wenn es einen Hinweis auf einen möglichen Unterschied in der mRNA-Expression der untersuchten Kanäle gab, wurden die Northern Blots oder die RT-PCR-Analysen mit RNA von einzelnen Tieren wiederholt.

### **2.11 Northern Blot**

Bei einem Northern Blot wird gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran transferiert und fixiert. Man nennt das Verfahren auch Kapillar-Blot, da der Transfer von dem

Gel auf die Membran durch die Kapillarkräfte des Filterpapiers vollzogen wird. Es folgt ein Nachweis spezifischer Sequenzen durch Hybridisierung mit einer nichtradioaktiv markierten RNA-Sonde. Die Signale werden durch eine immunologische Detektion sichtbar gemacht. Ein Nukleinsäure-Blot kann mehrfach verwendet und mit verschiedenen Proben hybridisiert werden. Der Transfer und die Hybridisierung müssen RNase-frei durchgeführt werden.

### 2.11.1 Herstellung nichtradioaktiver Sonden

Zur Herstellung der Sonden wurden die CLC-Chloridkanalkonstrukte linearisiert. Die Markierungsreaktion erfolgte mit Hilfe des DIG-RNA-Labeling-Kits (Roche). Dieses System basiert nicht auf der Verwendung von Isotopen, sondern von Digoxigenin, einem Hapten, welches ausschließlich in Digitalispflanzen vorkommt. So werden bei der Detektion der Sonde endogene Hintergrundprobleme vermieden, die im Falle anderer Haptene wie zum Beispiel Biotin auftreten können. Eine RNA-Sonde hat den Vorteil, dass RNA-RNA-Hybride stabiler sind als DNA-RNA-Hybride oder DNA-DNA-Hybride. Die RNA-Sonde ist einzelsträngig und somit ist jede Sonde ein Partner für das Zielmolekül.

Die verwendeten DNA-Konstrukte (siehe Abschnitt 3.1) wurden mit einem Enzym linearisiert, das einen 5'-Überhang erzeugt. Hierdurch wird eine nicht-spezifische Bindung der RNA-Polymerasen an freie 3'-Enden vermieden. Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde auf einem Agarosegel überprüft (siehe Abschnitt 2.6.2). Das linearisierte Plasmid wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Abschnitt 2.7.1) und einer Ethanol-Fällung (siehe Abschnitt 2.7.2) unterzogen, um Proteinreste und RNasen zu entfernen. Die Reagenzien wurden in angegebener Reihenfolge in ein steriles, RNase-freies Reaktionsgefäß gegeben, und ein RNase-Inhibitor wurde hinzugefügt. Nach vorsichtigem Mischen der Reagenzien wurde der Ansatz kurz zentrifugiert. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei 37°C und ein Abstoppen der Reaktion mit 2 µl EDTA (0,2 M, pH 8). Der Markierungsansatz wurde durch Zugabe von DMPC-Wasser auf 100 µl aufgefüllt.

Der Markierungsansatz war folgendermaßen:

Linearisierte und gereinigte DNA	1 µg
NTP-Markierungs-Gemisch	2 µl
10 x Transkriptions-Puffer	2 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
RNA-Polymerase T7 oder T3	2 µl
DMPC-Wasser	ad 20 µl

### 2.11.2 Tüpfeltest

Ein Tüpfeltest wurde durchgeführt, um das Gelingen und die Ausbeute der Markierungsreaktion zu überprüfen. Nachdem eine Verdünnungsreihe der DIG-markierten Sonde und der DIG-markierten Kontroll-RNA aus dem Kit hergestellt und auf eine Nylonmembran (Roche) aufgetragen war, wurde eine Detektion, wie im Abschnitt 2.11.6 beschrieben, durchgeführt. So konnte die Sondenkonzentration für die Hybridisierung optimal eingestellt werden.

Für die Herstellung der Verdünnungsreihe wurde DMPC-Wasser verwendet und die hier aufgeführte Verdünnungsreihe hergestellt:

Gefäß Nr.	RNA [ $\mu$ l] aus Gefäß Nr.	DMPC-Wasser	Gesamt-volumen	Verdünnung	End-konzentration
1	2 $\mu$ l aus Original/Kontrolle	198 $\mu$ l	200 $\mu$ l	1:100	1 ng/ $\mu$ l
2	15 $\mu$ l aus Gefäß Nr. 1	35 $\mu$ l	50 $\mu$ l	1:3.3	300 pg/ $\mu$ l
3	5 $\mu$ l aus Gefäß Nr. 1	45 $\mu$ l	50 $\mu$ l	1:10	100 pg/ $\mu$ l
4	5 $\mu$ l aus Gefäß Nr. 2	45 $\mu$ l	50 $\mu$ l	1:10	30 pg/ $\mu$ l
5	5 $\mu$ l aus Gefäß Nr. 3	45 $\mu$ l	50 $\mu$ l	1:10	10 pg/ $\mu$ l
6	5 $\mu$ l aus Gefäß Nr. 4	45 $\mu$ l	50 $\mu$ l	1:10	3 pg/ $\mu$ l
7	5 $\mu$ l aus Gefäß Nr. 5	45 $\mu$ l	50 $\mu$ l	1:10	1 pg/ $\mu$ l
8	5 $\mu$ l aus Gefäß Nr. 6	45 $\mu$ l	50 $\mu$ l	1:10	0,3 pg/ $\mu$ l
9	5 $\mu$ l aus Gefäß Nr. 7	45 $\mu$ l	50 $\mu$ l	1:10	0,1 pg/ $\mu$ l
10	5 $\mu$ l aus Gefäß Nr. 8	45 $\mu$ l	50 $\mu$ l	1:10	0,03 pg/ $\mu$ l
11	5 $\mu$ l aus Gefäß Nr. 9	45 $\mu$ l	50 $\mu$ l	1:10	0,01 pg/ $\mu$ l
12	0	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	-	0

Nachdem ein Stück Nylonmembran (Roche) zurecht geschnitten war, wurde je 1  $\mu$ l der Verdünnungen 5–12 pro Sonde auf die Membran aufgetragen. Die Membran wurde durch kurzes Auflegen auf ein mit 2 x SSC-Puffer getränktes Whatman-Papier befeuchtet und die RNA mit Hilfe des UV-Stratalinkers 2400 (Stratagene) auf der Membran fixiert. Die immunologische Detektion erfolgte, wie im Abschnitt 2.11.6 beschrieben, und die Exposition mit Hilfe des Lumi-Imagers (siehe Abschnitt 2.11.7).

Die Sonde gilt als sehr gut, wenn fünf oder mehr Punkte der Verdünnungsreihe (0,1 pg/ $\mu$ l) detektiert werden können. Das heißt, man hat mindestens 10  $\mu$ g DIG-markierte RNA-Sonde hergestellt, und die Sondenkonzentration in dem Markierungsansatz beträgt ungefähr 100 ng/ $\mu$ l. Bei der Hybridisierung wird dann 1  $\mu$ l dieser Sonde pro 1 ml Hybridisierungslösung eingesetzt.

### 2.11.3 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Bei einem RNA-Gel müssen alle beteiligten Materialien wie Pipettenspitzen, Gelelektrophoresekammern, -schlitten und -kämme RNase-frei sein. Wenn die Materialien

## Material und Methoden

---

nicht steril verpackt und RNase-frei sind, werden sie mit RNase-Zap (Sigma) behandelt und anschließend mit DMPC-Wasser gespült.

### Gel

Agarose	1,2 g	Bio-Rad
10 x MOPS-Puffer	12 ml	
DMPC-Wasser	101,4 ml	
37%iges Formaldehyd	6,6 ml	Merck

Agarose, MOPS-Puffer und DMPC-Wasser wurden in der Mikrowelle aufgekocht und auf ca. 60°C abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 6,6 ml Formaldehyd und das Gießen des Gels in einen Gelschlitten, der vorher mit einem Klebeband an den Seiten abgedichtet worden war.

### RNA-Ladepuffer

Formamid	250 µl	Roth
10 x MOPS-Puffer	50 µl	
37%iges Formaldehyd	83 µl	Merck
Bromphenolblau-Stammlösung 0,01%	10 µl	Bio-Rad
Ethidiumbromid, bei Bedarf	3 µl	Bio-Rad

Der Ladepuffer wurde stets frisch angesetzt, da es bei Lagerung des Puffers zu einer Reaktion zwischen Formamid und Formaldehyd kommen kann, die zur Degradierung der RNA führt.

### RNA-Laufpuffer

1 x MOPS

Der Laufpuffer wurde aus 10 x MOPS-Puffer und DMPC-Wasser angesetzt.

Die Proben wurden mit dem 2–3-fachen Volumen an Ladepuffer versetzt und 10 min bei 65°C denaturiert. Danach wurden sie wieder auf Eis gestellt. Wegen des Verzichts auf einen Glycerin-Zusatz im Ladepuffer (Gefahr der RNase-Kontamination) wurde das Gel trocken beladen. Das heißt, der Laufpuffer wurde nur bis zur Gel-Oberkante in die Elektrophoresekammer gegossen, und die Proben wurden in die Taschen geladen und bei Bedarf mit 1 x MOPS aufgefüllt. Die Proben ließ man ungefähr 10 min bei 60 V in das Gel einlaufen. Danach wurde die Elektrophoresekammer mit 1 x MOPS aufgefüllt und die Gelelektrophorese über Nacht bei 15 V durchgeführt. Durch den langsamen Gellauf wurden die Banden sehr gut aufgetrennt.

### 2.11.4 Blotting

Das Gel wurde 10 min in RNase-freiem 20 x SSC-Puffer (Sigma) äquilibriert und dann unterhalb der Taschen mit einem Skalpell abgeschnitten. Während dieser Zeit wurde der Blot vorbereitet: das Whatman-Papier, ein Stapel saugfähiges Papier und die Nylonmembran (Roche) wurden zurecht geschnitten.

Es folgte das Auffüllen des Pufferreservoirs mit Transferpuffer und das Benetzen der „Brücke“, bestehend aus einem umgedrehten Gelschlitten und einer Lage Whatman-Papier, mit dem Transferpuffer (20 x SSC). Der Blot wurde, wie in Abbildung 9 dargestellt, aufgebaut und das Gel hierbei mit der Unterseite nach oben auf die Brücke gelegt. Anschließend wurden eventuell entstandene Luftblasen entfernt und die Nylonmembran, drei Lagen Whatman-Papier und ein Stapel saugfähiges Papier auf das Gel gelegt. Das Ganze wurde mit einer Platte abgedeckt und mit einem Gewicht beschwert. Man ließ den Blot über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Am nächsten Morgen wurden das Gewicht, die Glasplatte und das Papier entfernt und die transferierte RNA mit Hilfe des UV-Stratalinkers 2400 (Stratagene) auf der Nylonmembran fixiert. Die Membran wurde kurz in DMPC-Wasser gewaschen, in Folie eingeschweißt (Schweißgerät Severin TYP 3600) und bei 4°C aufbewahrt.

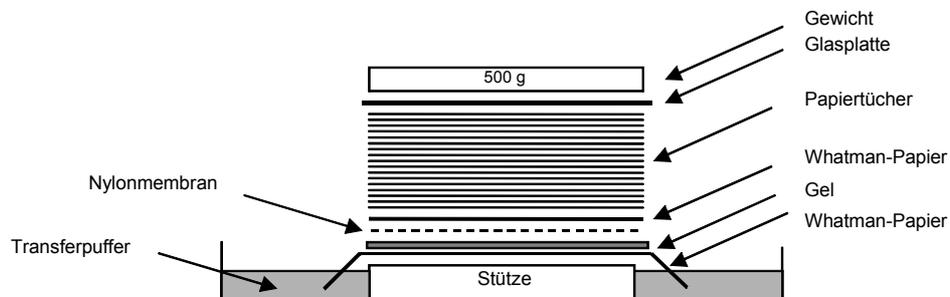


Abbildung 9: Der Aufbau für einen Kapillar-Blot in schematischer Darstellung. Auf einer Stütze befindet sich eine Schicht Whatman-Papier, das wie eine Brücke auf beiden Seiten in den Transferpuffer hängt. Darauf werden das Gel, die Nylonmembran, drei Lagen Whatman-Papier, ein Stapel saugfähiges Papier, eine Glasplatte und ein Gewicht gestapelt. Die RNA wird mit Hilfe von Kapillarkräften vom Gel auf die Nylonmembran übertragen.

### 2.11.5 Hybridisierung

Die Prähybridisierung und die Hybridisierung werden mit Hilfe von Hybridisierungsröhren in einem Hybridisierungssofen (HYBAID Typ 743, Biometra) durchgeführt. Die Hybridisierungsröhren sind mit Hilfsmembranen bestückt. Sowohl die Röhren als auch die Hilfsmembranen werden mit DMPC RNase-frei gemacht. Während der Hybridisierung darf die Membran nicht an- oder austrocknen, da dies nach der Detektion zu hohen Hintergrundsignalen führen kann.

Zur Prähybridisierung wurde die eingeschweißte Nylonmembran mit der Hilfsmembran eingerollt, in die Hybridisierungsröhre gegeben und dort wieder aufgerollt. Nach Zugabe von 15 ml DIG-Easy-Hyb-Puffer (Roche) wurde die Membran für mindestens 30 min bei 68°C im Hybridisierungssofen prähybridisiert.

## Material und Methoden

---

Für die Hybridisierung wurden 7 ml des auf 68°C vorgewärmten DIG-Easy-Hyb-Puffers eingesetzt. Die benötigte Menge an DIG-RNA-Sonde, um eine Konzentration von 100 ng DIG-markierte RNA-Sonde pro ml zu erhalten, wurde für 5 min bei 100°C im Wasserbad (Thermomix 1441, Braun) denaturiert und danach auf Eis gestellt. Nach Zugabe der denaturierten Sonde zu dem vorgewärmten DIG-Easy-Hyb-Puffer wurde der Prähybridisierungspuffer aus der Röhre entfernt und gegen den Hybridisierungspuffer mit der Sonde ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C im Hybridisierungssofen.

### 2.11.6 Waschen und Detektion

Während der Hybridisierung bilden sich Duplexmoleküle zwischen Sonde und RNA aus. Um Hybridisierungen zwischen weniger homologen Sequenzen zu verhindern, muss mit entsprechender Stringenz gewaschen werden. Die Stringenz der Wasch-Schritte wird durch die Variation der Salzkonzentration sowie der Temperatur erreicht.

Die zum Waschen benötigten Puffer wurden mit DMPC-Wasser angesetzt und die Wasch-Schritte in RNase-freien Gefäßen durchgeführt. Der "Hoch-Stringenz"-Waschpuffer wurde vor Beginn der Wasch-Schritte auf 68°C vorgewärmt. Nach Abschluss der Hybridisierung wurde zweimal für 5 min mit "Niedrig-Stringenz"-Waschpuffer bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung auf einem Schüttler (Celloshaker Variospeed, Biotec-Fischer) gewaschen. Es folgten zwei weitere Wasch-Schritte für 15 min mit dem vorgewärmten "Hoch-Stringenz"-Waschpuffer bei 68°C in einem Schüttelwasserbad (Köttermann).

Die Zusammensetzung der Waschpuffer war folgendermaßen:

"Hoch-Stringenz"-Waschpuffer

20 x SSC	5 ml	Sigma
10% SDS	10 ml	Sigma
DMPC-Wasser	ad 1000 ml	

"Niedrig-Stringenz"-Waschpuffer:

20 x SSC	100 ml	Sigma
10% SDS	10 ml	Sigma
DMPC-Wasser	ad 1000 ml	

Die Hybride zwischen Ziel-RNA und DIG-markierter Sonde werden in einem immunologischen Verfahren mit einem Anti-DIG-Antikörper detektiert. Der Antikörper wird als Konjugat mit alkalischer Phosphatase eingesetzt. Die Bindung des Antikörpers wird durch eine enzymatische Reaktion sichtbar gemacht. Dabei wird ein Chemilumineszenz-Substrat verwendet, welches nach enzymatischer Umsetzung Licht emittiert.

Die zur Detektion benötigten Puffer wurden mit Hilfe des DIG-Wash-and-Block-Buffer-Sets (Roche) nach Herstellerangaben mit DMPC-Wasser angesetzt. Bei jedem Detektionsvorgang wurde sowohl die Antikörperverdünnung (Roche) (1:10000 in Blockierungslösung) als auch die Verdünnung des Chemilumineszenz-Substrats CDP-Star (Roche, 1:100 in Detektionspuffer) frisch angesetzt. Die Arbeitsschritte erfolgten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur.

Zuerst wurde die Membran für 2 min mit Waschpuffer äquilibriert und 30 min in Blockierungslösung inkubiert. Daraufhin folgte die Antikörperbindung durch Zugabe der Antikörperlösung für 30 min. Es wurde zweimal je 15 min mit Waschpuffer gewaschen und 5 min mit Detektionspuffer äquilibriert. Die Durchführung der Chemilumineszenz-Reaktion war folgendermaßen: Die Membran wurde mit der RNA-Seite nach oben auf eine Folie gelegt und mit 1 ml CDP-Star-Lösung beträufelt. Anschließend wurde sie mit der Folie abgedeckt und die Lösung vorsichtig verteilt; eventuell auftretende Luftblasen wurden entfernt. Nach einer Inkubationszeit für 5 min bei Raumtemperatur wurde der Überschuss an CDP-Star durch Ausstreichen entfernt und die Membran eingeschweißt.

### **2.11.7 Auswertung mit dem Lumi-Imager**

Die Lumi-Imager-Workstation (Roche) ermöglicht die Analyse, Quantifizierung und Dokumentation nichtradioaktiv markierter Nukleinsäuren, die über Chemilumineszenz detektiert werden. Der im Vergleich zum Röntgenfilm mehr als 100-fach größere dynamische Bereich des Systems erlaubt eine exakte und verlässliche Quantifizierung.

Der Lumi-Imager besteht aus einer CCD-Kamera (Charged-Coupled Device) und optischen Geräten in einem kleinen Dunkelraum. Der zentrale Teil der CCD-Kamera ist ein Siliziumchip, der ein Lumineszenz-Signal in ein elektrisches Signal umwandelt. Der CCD-Chip wird mit Hilfe eines Peltier-Kühlsystems und Ventilatoren auf  $-35^{\circ}\text{C}$  gekühlt, um thermisches Rauschen zu vermeiden und höchste Sensitivität zu erreichen. Das Gerät ist mit einem Computer verbunden. Das Lichtsignal von dem Northern Blot wird von der CCD-Kamera detektiert und zur Kontrolleinheit übertragen. Von dort werden die Daten an den Computer geschickt, wo sie mit Hilfe einer Software (Lumi-Analyst, Media Cybernetics) analysiert und dokumentiert werden können.

Aufgrund einer großen Vielfalt der Signale, von ganz schwach bis sehr intensiv, stellt sich die Frage, ob die Auswertung mit Hilfe des Lumi-Imagers immer der Realität entspricht, oder ob eine „Sättigung“ bei sehr intensiven Signalen zu erwarten ist. Ob die Messwerte des Lumi-Imagers innerhalb eines linearen Bereiches liegen, wurde deshalb mittels einer Verdünnungsreihe der G3PDH-RNA-Sonde überprüft.

## Material und Methoden

---

Es wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt:

Gefäß Nr.	G3PDH-Sonde	Wasser	Verdünnung	Endkonzentration
1	2 µl	198 µl	1:100	1 ng/µl
2	25 µl aus 1	25 µl	1:2	500 pg/µl
3	15 µl aus 1	35 µl	1:3,3	300 pg/µl
4	5 µl aus 1	45 µl	1:10	100 pg/µl
5	5 µl aus 2	45 µl	1:10	50 pg/µl
6	5 µl aus 3	45 µl	1:10	30 pg/µl
7	5 µl aus 4	45 µl	1:10	10 pg/µl
8	5 µl aus 5	45 µl	1:10	5 pg/µl
9	5 µl aus 6	45 µl	1:10	3 pg/µl
10	5 µl aus 7	45 µl	1:10	1 pg/µl
11	5 µl aus 8	45 µl	1:10	0,5 pg/µl
12	5 µl aus 9	45 µl	1:10	0,3 pg/µl
13	5 µl aus 10	45 µl	1:10	0,1 pg/µl

Anschließend wurden die Lösungen aus den Gefäßen 4 bis 13 in vier Ansätzen auf eine Nylonmembran aufgetragen, detektiert (siehe Abschnitt 2.11.6) und mit Hilfe des Lumi-Imagers analysiert. Die Nylonmembranen sind in Abbildung 10B abgebildet.

Es folgte eine Auswertung mit dem Lumi-Analyst und ein Auftragen der gemessenen Signale pro Messpunkt in logarithmischer Darstellung (siehe Abbildung 10A). Hier war zu erkennen, dass die Messpunkte der einzelnen Verdünnungen sehr nahe beieinander liegen und sich die acht Verdünnungen, von 0,1 bis 30 pg/µl, nach einem linearen Fit annähernd auf einer Geraden befinden ( $n = 8$ ;  $Sd = 0,11583$ ;  $p < 0,0001$ ). Das bedeutet, dass dieser Messbereich von 1000 bis 3000000 BLU optimal genutzt und ausgewertet werden kann. Bei höheren Signalen nimmt die Messgenauigkeit ab, und diese wurden deshalb nicht in die Auswertung einbezogen.

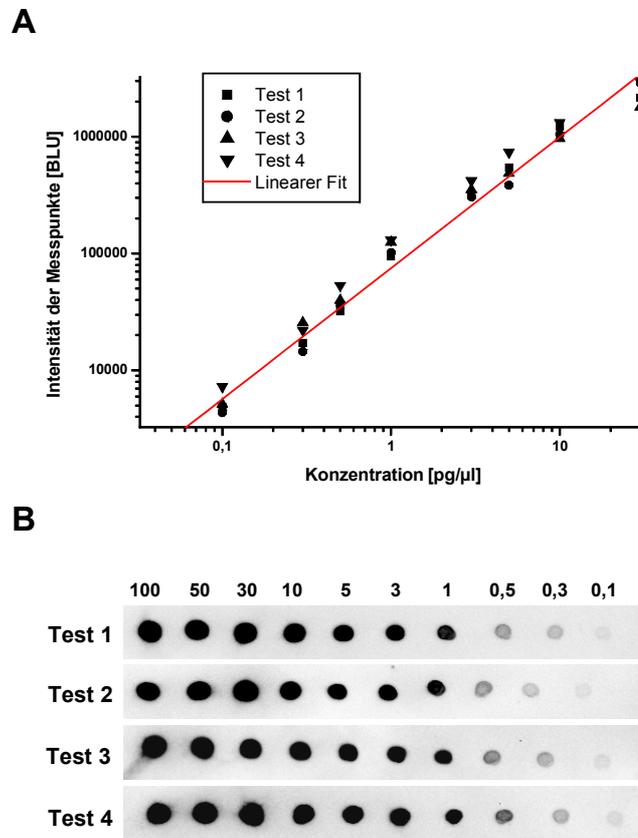


Abbildung 10: Bei **A** ist auf der x-Achse die Konzentration der Probe gegen die Signalintensität auf der y-Achse aufgetragen. Die Messwerte aus den vier Versuchen (Test 1-4) sind mit verschiedenen Symbolen (■ • ▲ ▼) dargestellt. In **B** werden die vier Nylonmembranen, auf die jeweils die Verdünnungsreihe aufgetragen wurde, nach der Detektion gezeigt.

### 2.11.8 Sondenentfernung

Um eine Sonde von einem schon hybridisierten Blot zu entfernen und diesen erneut zu hybridisieren, wird der Blot mit einem speziellen Puffer gewaschen.

Der Puffer wurde folgendermaßen hergestellt:

Formamid	50 ml	Roth
10% SDS	50 ml	Sigma
Tris-HCl	0,788 g	GibcoBRL

Der Puffer wurde auf pH 7,5 eingestellt.

Nach einem kurzen Waschen des Blots nach der letzten Detektion mit DMPC-Wasser wurde er zweimal für je 45 min im Schüttelwasserbad bei 80°C mit dem Puffer inkubiert. Danach wurde der Blot kurz mit 2 x SSC (mit DMPC-Wasser angesetzt) gewaschen. Er konnte nun erneut prähybridisiert und hybridisiert werden. Nach jeder Hybridisierung erfolgte die Sondenentfernung und die Hybridisierung mit einer G3PDH-Sonde (G3PDH-Kontrolle von Clontech, Kat.-Nr. 9805-1, die nur noch markiert werden muss). Diese Sonde wurde als Standard verwendet.

### **2.12 Auswertung und Statistik**

Die Northern Blots wurden mit Hilfe des Lumi-Imagers und der dazugehörigen Software (Lumi-Analyst, Version 3.0, Media Cybernetics) und die RT-PCR-Analysen mit dem Gel-Pro-Analyzer (Intas) und der dazugehörigen Software (Version 3.1, Media Cybernetics) ausgewertet.

Mittelwerte, Standardabweichung (Sd), Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M. für Standard Error of the Mean) wurden mit Hilfe von Origin Version 5.0 (Microcal Software) berechnet. Ebenso wurden alle Diagramme mit Hilfe dieses Programms erstellt.

Die Werte wurden mit dem gepaarten Student t-Test auf Signifikanz geprüft ( $p < 0,05$  oder  $p < 0,01$ ). Bei allen folgenden Abbildungen wird die Signifikanz mit einem \* ( $p < 0,05$ ), zwei \*\* ( $p < 0,01$ ) oder drei Sternchen \*\*\* ( $p < 0,001$ ) gekennzeichnet.

### 3 Ergebnisse

Die ersten drei Abschnitte in diesem Kapitel befassen sich mit der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle in sechs verschiedenen Tiermodellen mit folgenden kardiovaskulären Krankheitsbildern: Bluthochdruck und kardialer Hypertrophie, Herzinsuffizienz sowie Niereninsuffizienz. Der vierte Abschnitt widmet sich einem neu etablierten Tiermodell für Vorhofflimmern und der Genexpression verschiedener Ionenkanäle im Herzen.

#### 3.1 Bluthochdruck und kardiale Hypertrophie und die Genexpression der CLC-Chloridkanäle

Eine der bedeutendsten Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist der Bluthochdruck und damit verbunden die kardiale Hypertrophie. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle in Tieren mit Bluthochdruck und kardialer Hypertrophie untersucht. Die Tiere entwickeln diese Symptome entweder spontan wie die SHR oder SHR-SP, aufgrund einer speziellen Salzdiät wie die Dahl-Ratten oder nach einer Operation wie im Falle der Aortic-Banding-Ratten (siehe Abschnitt 1.3).

Für die Chloridkanäle CLC-2, CLC-3, CLC-4, CLC-5, CLC-6 und CLC-7 wurden die Analysen in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Northern Blots durchgeführt. Dafür wurden die in Tabelle 1 beschriebenen Konstrukte verwendet.

Tabelle 1: cDNA-Klone, die zur Herstellung der RNA-Sonden für die Northern Blots verwendet wurden. Aufgeführt sind die cDNA-Fragmente, die zur Linearisierung verwendeten Enzyme und die zur Sondenmarkierung notwendigen RNA-Polymerasen.

cDNA-Klon	cDNA-Fragment	Neuer Vektor	Linearisierung mit	Sondenmarkierung mit	Größe der Sonde
rCLC-2	AvaI – SacI	pSPT18	AvaI	T7 RNA-Polymerase	1,1 kb
hCLC-5	SacI – KpnI	pSPT19	EcoRI	T7 RNA-Polymerase	1,1 kb
hCLC-6	XbaI - SmaI	pSPT18	XbaI	T7 RNA-Polymerase	1,2 kb
rCLC-7	BamHI - EcoRI	pSPT18	BamHI	T7 RNA-Polymerase	2,2 kb
hCLC3	Volle Länge	pCIneo	ApaLI	T3 RNA-Polymerase	1,6 kb
hCLC4	Volle Länge	pCIneo	ApaLI	T3 RNA-Polymerase	1,6 kb

## Ergebnisse

Als Standard diente G3PDH. Für die Transkripte der einzelnen CLC-Chloridkanäle und G3PDH wurden die in der Tabelle 2 aufgezeigten Bandengrößen im Northern Blot beobachtet:

Tabelle 2: Transkriptgrößen der CLC-Chloridkanäle.

Chloridkanal bzw. Standard	Größe des Transkripts
CLC-2	~ 3,3 kb und 4,5 kb
CLC-3	~ 4,0 kb und 6,5 kb
CLC-4	~ 4,5 kb und 7,5 kb
CLC-5	~ 9,5 kb
CLC-6	~ 6,0 kb
CLC-7	~ 4,2 kb
G3PDH	~ 1,3 kb

Für die Chloridkanäle CLC-K1 und CLC-K2 erfolgte die Analyse der mRNA-Expression aufgrund ihrer großen Homologie mit Hilfe der Zwei-Schritt-RT-PCR. Dafür wurden die bereits in der Literatur beschriebenen Primer und Reaktionsbedingungen (siehe Abschnitt 2.9) verwendet (Kieferle *et al.*, 1994). Die Primer für CLC-K1, CLC-K2 und für den internen Standard  $\beta$ -Actin sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Produkte aus der RT-PCR waren für CLC-K1 sowie CLC-K2 275 bp und für  $\beta$ -Actin 240 bp groß.

Tabelle 3: Primer, die für die Zwei-Schritt-RT-PCR-Analyse für CLC-K1, CLC-K2 und den Standard  $\beta$ -Actin verwendet wurden.

Primer	Sequenz
rCLC-K1 vorwärts	5' AGA CCA TGC TGT CCG GTG TGG 3'
rCLC-K1 rückwärts	5' GAA GGG GGC TGC GAA AAC T 3'
rCLC-K2 vorwärts	5' AAA CCA TCT TGA CAG GTG TGA 3'
rCLC-K2 rückwärts	5' GAT TGG GGC GGC GAA GAC C 3'
$\beta$ -Actin vorwärts	5' CGT GGG CCG CCC TAG GCA CCA 3'
$\beta$ -Actin rückwärts	5' TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G 3'

Die Northern Blot- und RT-PCR-Analysen wurden mit Pools von RNA generiert, das heißt, ein Wert entspricht bereits einem Mittelwert von mehreren Tieren. Eine statistische Auswertung mit Standardfehler oder Mittelwert ist deshalb nicht möglich. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Northern Blots und RT-PCR-Analysen mehrmals wiederholt.

## Ergebnisse

### 3.1.1 Das Modell der spontan hypertensiven Ratte (SHR)

Die Nieren und das Herz der SHR wurden im Alter von 6 Wochen und 18 Monaten untersucht. Die 6 Wochen alten Tiere haben einen normalen Blutdruck. Ab dem Alter von 13 Wochen manifestiert sich der hohe systolische Blutdruck (bis zu 180 mmHg) und führt zu einer linksventrikulären Hypertrophie und Nephropathie der 18 Monate alten Tiere.

Abbildung 11 zeigt die Resultate von Northern Blot-Analysen für die CLC-Chloridkanäle CLC-2, CLC-3, CLC-4, CLC-6 und CLC-7 im Herzen der SHR. Aufgrund seines spezifischen Vorkommens in der Niere beschränkte sich die Analyse des Chloridkanals CLC-5 ausschließlich auf dieses Organ. Es wurde eine gleichmäßige Signalintensität für die mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle beobachtet. Die Größen der Banden entsprachen den Werten, die in Tabelle 2 beschrieben wurden.

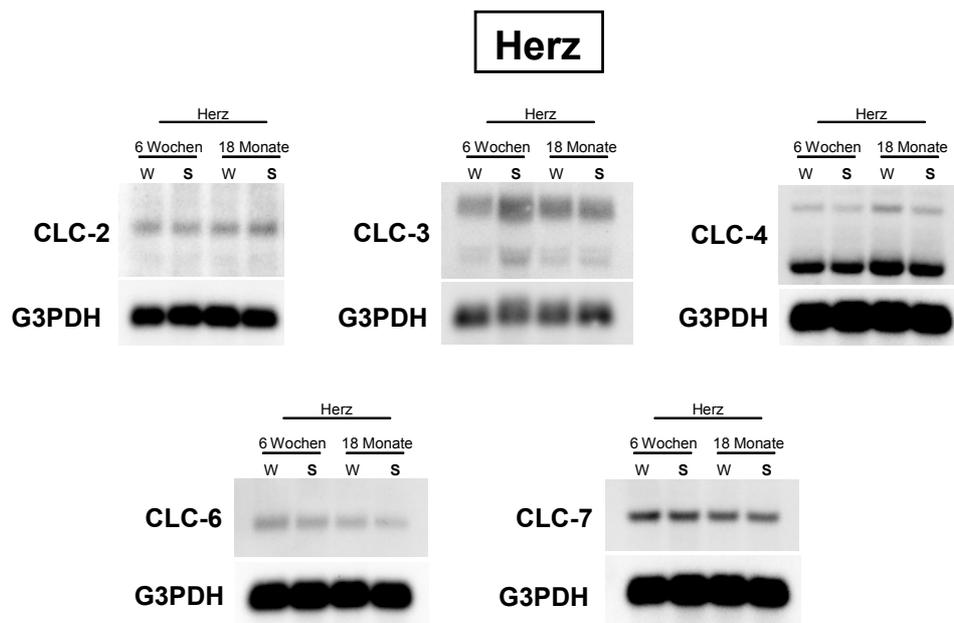


Abbildung 11: Exemplarische Northern Blots für die Chloridkanäle CLC-2, CLC-3, CLC-4, CLC-6 und CLC-7 und den Standard G3PDH. Untersucht wurden die Herzen von spontan hypertensiven Ratten (S) und Wistar-Kyoto-Ratten (W) in 6 Wochen bzw. 18 Monate alten Tieren.

In Abbildung 12 werden Northern Blots und ein Agarosegel mit Produkten aus den RT-PCR-Experimenten der CLC-Chloridkanäle gezeigt, die mit RNA aus den Nieren der SHR und WKY-Ratten hergestellt wurden.

## Ergebnisse

### Niere

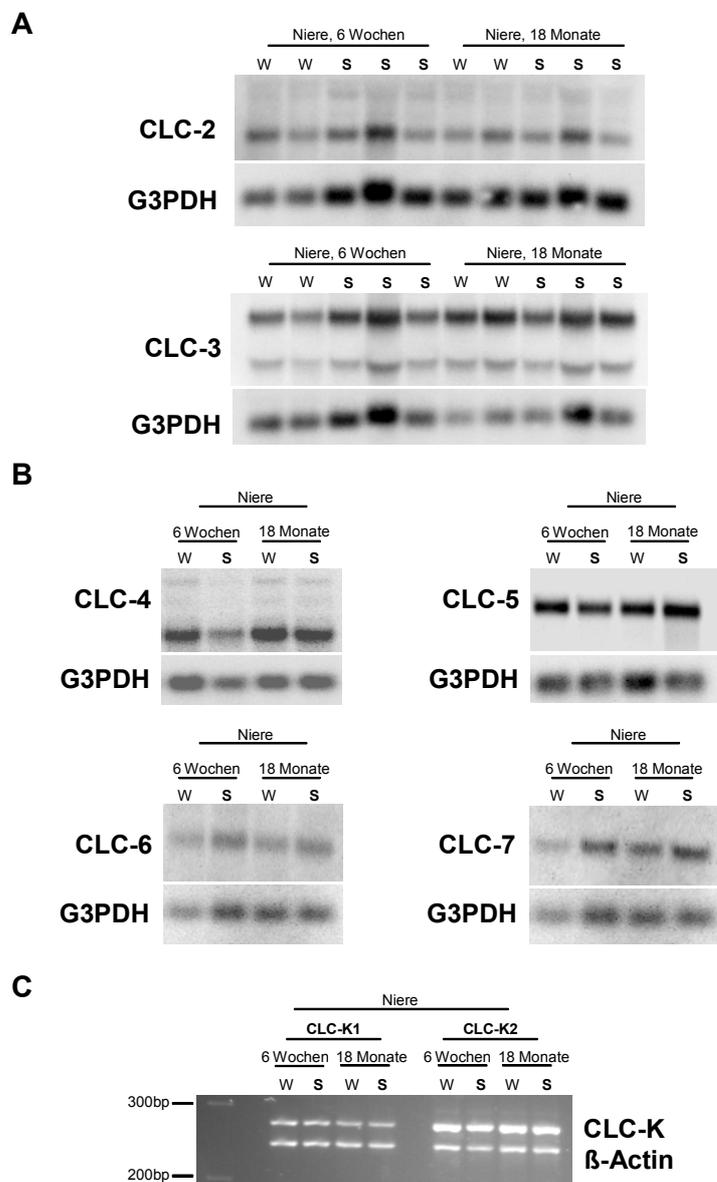
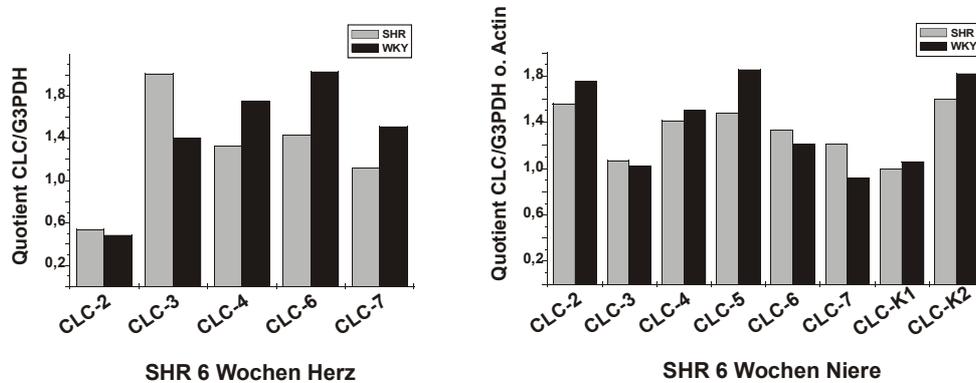


Abbildung 12: **A** und **B** Ergebnisse exemplarischer Northern Blot-Analysen für die Chloridkanäle CLC-2 bis CLC-7 und den Standard G3PDH. Bei **C** sind die Produkte aus der RT-PCR-Analyse für CLC-K1 und CLC-K2 und den Standard  $\beta$ -Actin in einem Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel dargestellt. Untersucht wurden die Nieren von spontan hypertensiven Ratten (S) und Wistar-Kyoto-Ratten (W) in 6 Wochen bzw. 18 Monate alten Tieren.

## Ergebnisse

Zwei Beispiele für Northern Blots, die mit RNA aus einzelnen Tieren generiert wurden, sind in Abbildung 12A (CLC-2 und CLC-3) abgebildet. Hierbei wurden Schwankungen in der Signalintensität zwischen den einzelnen Tieren beobachtet. Diese lagen jedoch identisch in dem Standard G3PDH vor und ergaben insgesamt betrachtet keinen Unterschied zwischen den SHR und den WKY-Ratten. Außerdem ist die mRNA-Expression von CLC-4 bis CLC-7 (siehe Abbildung 12B) mit Hilfe repräsentativer Northern Blots gezeigt. Die Produkte aus der RT-PCR-Analyse für CLC-K1 und CLC-K2 sind in einem Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel zu sehen (siehe Abbildung 12C).

**A**



**B**

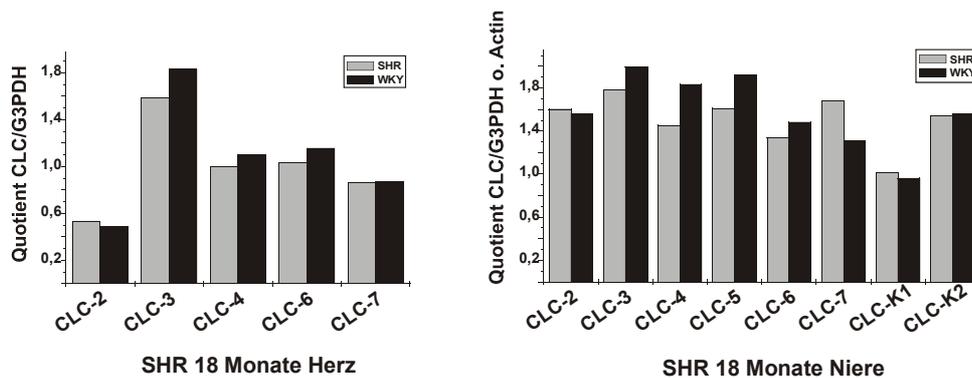


Abbildung 13: Relative Signalintensität der CLC-Chloridkanäle in Herzen und Nieren der **A** 6 Wochen bzw. **B** 18 Monate alten Tiere. Die SHR (n = 4) sind mit grauen und die Wistar-Kyoto-Ratten (WKY; n = 4) mit schwarzen Balken abgebildet.

In Abbildung 13 wird das Verhältnis der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle zu G3PDH oder zu  $\beta$ -Actin im Herzen und in den Nieren der 6 Wochen (siehe Abbildung 13A) und der

## Ergebnisse

18 Monate alten SHR (siehe Abbildung 13B) gezeigt. Als Kontrolltiere dienten gleichaltrige Wistar-Kyoto-Ratten (WKY).

Es wurde kein Unterschied in der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle in den SHR im Vergleich zu den normotensiven Kontrolltieren (WKY) sichtbar. Außerdem konnten die bereits bekannten Unterschiede in der mRNA-Expression, wie zum Beispiel ein schwaches Signal von CLC-2 im Herzen im Vergleich zur Niere (Thiemann *et al.*, 1992) und eine stärkere mRNA-Expression von CLC-3 im Herzen im Vergleich zu CLC-2 (Britton *et al.*, 2000), bestätigt werden.

### 3.1.2 Das Modell der SH-stroke-prone-Ratte (SHR-SP)

Die Nieren und das Herz der SHR-SP wurden nach 3 bzw. 9 Monaten untersucht. SHR-SP entwickeln einen malignen Bluthochdruck (bis zu 230 mmHg systolisch), der bereits im Alter von 3 Monaten ausgeprägt ist. Die Tiere haben eine verringerte Lebenserwartung, und in den 9 Monate alten Tieren sind die pathologischen Folgen des erhöhten Blutdruckes noch stärker ausgebildet als bei den SHR.

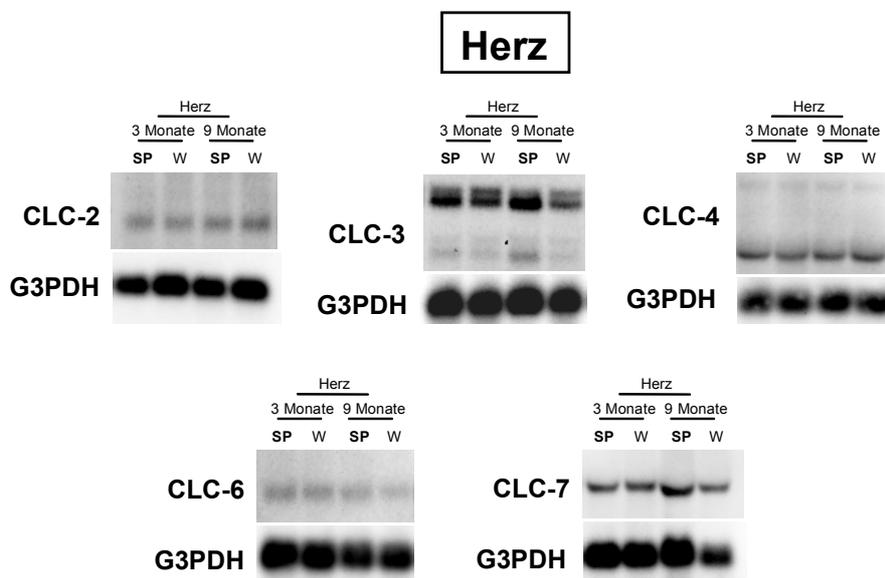


Abbildung 14: Exemplarische Northern Blots für die Chloridkanäle CLC-2, CLC-3, CLC-4, CLC-6 und CLC-7 und den Standard G3PDH. Untersucht wurden die Herzen von SHR-SP (SP) und Wistar-Kyoto-Ratten (W) in 3 Monate bzw. 9 Monate alten Tieren.

## Ergebnisse

In Abbildung 14 werden exemplarisch einige Northern Blots für CLC-2, CLC-3, CLC-4, CLC-6 und CLC-7 mit RNA aus dem Herzen der 3 und 9 Monate alten SHR-SP gezeigt. Auch hier wurde ein gleichmäßiges Bandenmuster und Signale in der richtigen Größe beobachtet.

Die Northern Blots und die Produkte aus den RT-PCR-Experimenten der CLC-Chloridkanäle, die mit RNA aus der Niere der SHR-SP gewonnen wurden, sind in Abbildung 15 dargestellt: Hier werden repräsentative Northern Blots für CLC-2 bis CLC-7 (siehe Abbildung 15A) und ein repräsentatives Agarosegel mit RT-PCR-Produkten von CLC-K1 und CLC-K2 (siehe Abbildung 15B) gezeigt. Alle Bandengrößen entsprechen den erwarteten Werten.

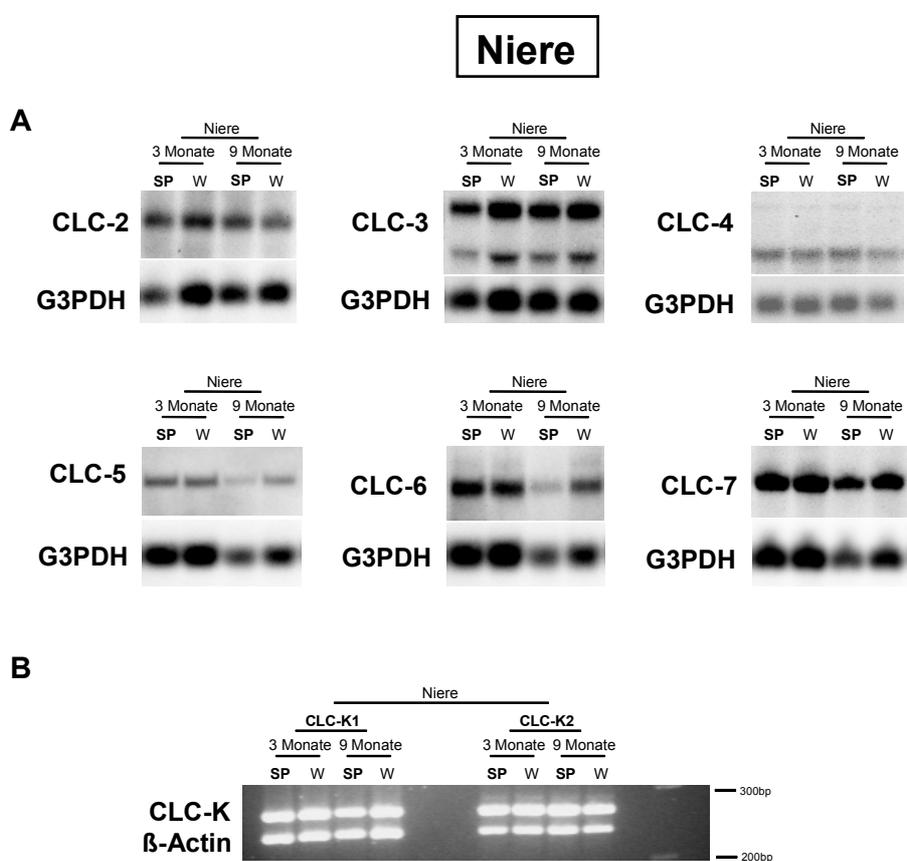


Abbildung 15: **A** Repräsentative Northern Blots für die Chloridkanäle CLC-2 bis CLC-7 und den Standard G3PDH und **B** Produkte aus der RT-PCR-Analyse für CLC-K1 und CLC-K2 mit dem Standard  $\beta$ -Actin in einem Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel. Untersucht wurden die Nieren von in 3 Monate bzw. 9 Monate alten SHR-SP (SP) und Wistar-Kyoto-Ratten (W).

## Ergebnisse

In Abbildung 16 ist das Verhältnis der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle zu G3PDH oder zu  $\beta$ -Actin in den Herzen und in den Nieren der 3 Monate und der 9 Monate alten SHR-SP dargestellt. Als Kontrolltiere dienten gleichaltrige Wistar-Kyoto-Ratten (WKY).

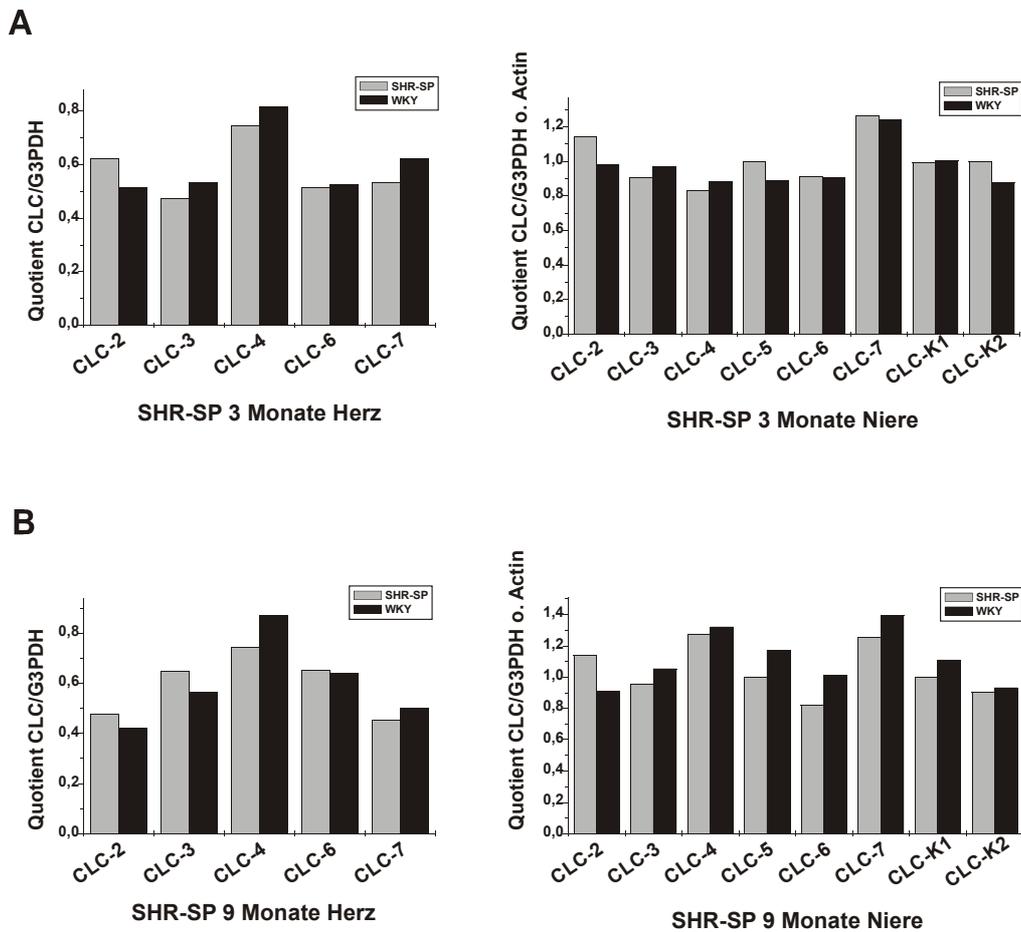


Abbildung 16: Relative Signalintensität der CLC-Chloridkanäle in Herzen und Nieren von **A** 3 Monate bzw. **B** 9 Monate alten Tieren. Die SHR-SP (n = 4) sind mit grauen und die Wistar-Kyoto-Ratten (WKY; n = 4) mit schwarzen Balken abgebildet.

Es wurde kein Unterschied in der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle in den hypertensiven SHR-SP im Vergleich zu den normotensiven gleichaltrigen Wistar-Kyoto-Ratten festgestellt.

### 3.1.3 Das Modell der salz-sensitiven Dahl-Ratte

Die salz-sensitiven Dahl-Ratten entwickeln nach einer dreimonatigen Diät mit hohem Salzgehalt einen hohen Blutdruck (bis zu 150 mmHg), die salz-resistenten Dahl-Ratten hingegen nicht. In Abbildung 17 sind Northern Blots und RT-PCR-Produkte als Beispiele dargestellt.

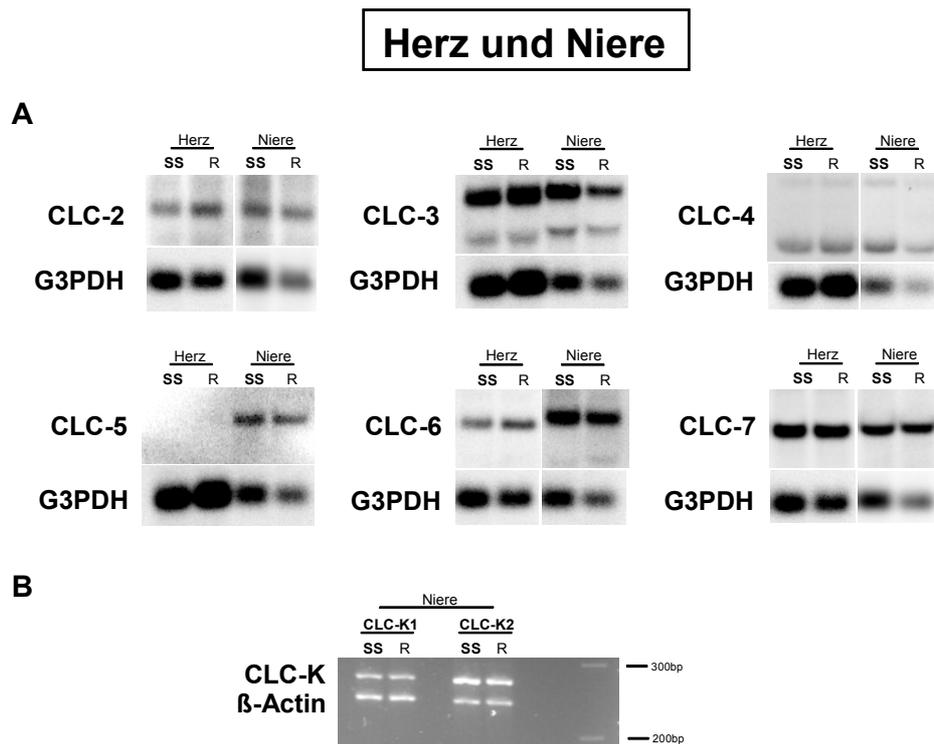


Abbildung 17: **A** Exemplarische Northern Blots für die Chloridkanäle CLC-2 bis CLC-7 und den Standard G3PDH und **B** Produkte aus der RT-PCR-Analyse für CLC-K1 und CLC-K2 mit dem Standard  $\beta$ -Actin (in einem Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel). Untersucht wurden die Herzen und die Nieren von salz-sensitiven (SS) und salz-resistenten (R) Dahl-Ratten.

Abbildung 18 zeigt das Verhältnis der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle zu G3PDH oder zu  $\beta$ -Actin im Herzen und in der Niere von salz-sensitiven und salz-resistenten Dahl-Ratten nach der beschriebenen dreimonatigen salzreichen Diät.

## Ergebnisse

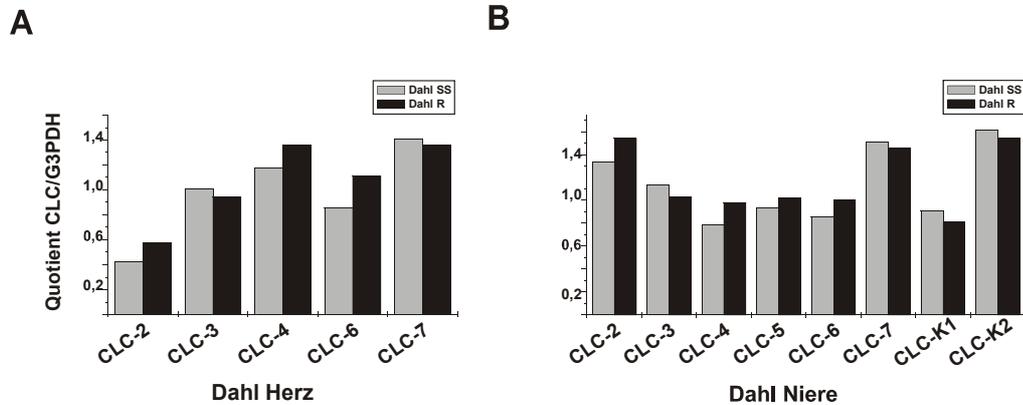


Abbildung 18: Relative Signalintensität der CLC-Chloridkanäle in **A** Herzen und **B** Nieren der beiden Dahl-Rattenstämme. Die salz-sensitiven Dahl-Ratten (Dahl SS; n = 3) sind mit grauen und die salz-resistenten Dahl-Ratten (Dahl R; n = 3) mit schwarzen Balken abgebildet.

Weder im Herzen noch in der Niere von salz-sensitiven und salz-resistenten Dahl-Ratten wurden Unterschiede in der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle nach der Salzzufuhr sichtbar.

### 3.1.4 Das Modell der Aortic-Banding-Ratte

Das Abschnüren der abdominalen Aorta oberhalb der linken renalen Arterie verursacht innerhalb eines Zeitraumes von zwei Wochen einen Renin-abhängigen Anstieg des Blutdruckes und nach längerer Zeit eine Hypertrophie der Herzkammern. Außerdem kann es zur Verkleinerung der linken Niere kommen, weshalb hier auch die linke und die rechte Niere getrennt untersucht wurden.

Als Beispiel für die mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle im Aortic-Banding-Modell sind in Abbildung 19 einige Northern Blots und Agarosegele mit RT-PCR-Produkten dargestellt. Es wurde RNA aus dem linken Ventrikel des Herzens und aus den Nieren der Aortic-Banding-Ratten sowie von scheinoperierten Tieren verwendet.

## Herz und Niere

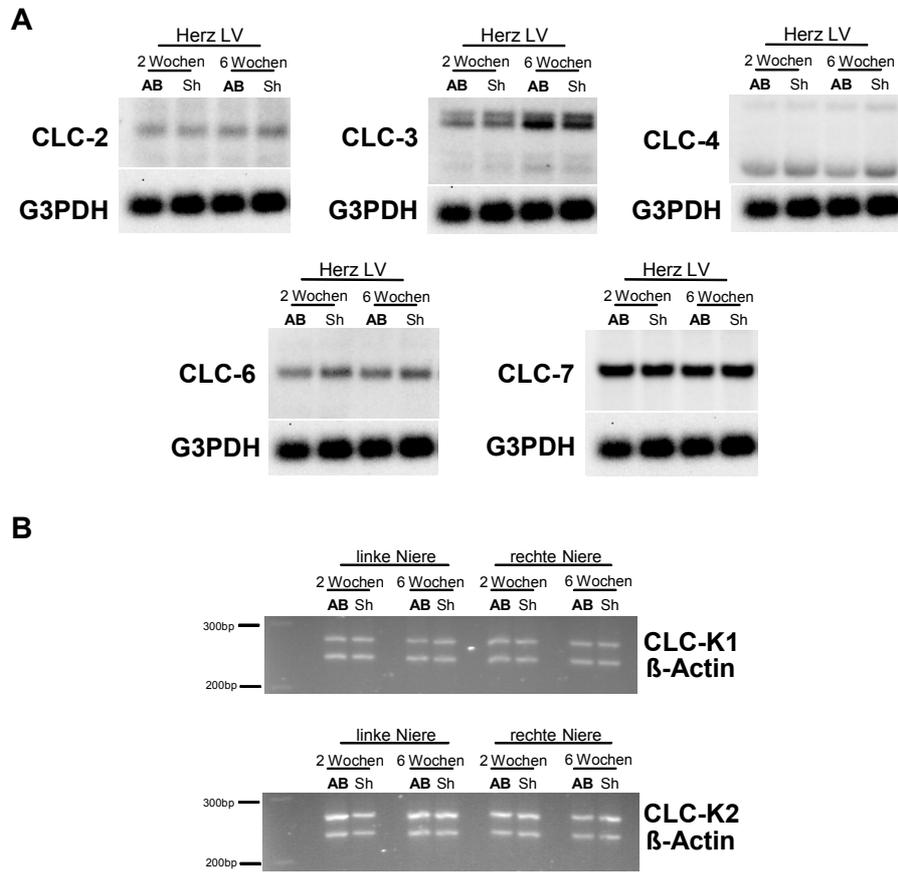


Abbildung 19: **A** Exemplarische Northern Blots für die Chloridkanäle CLC-2, CLC-3, CLC-4, CLC-6 und CLC-7 und den Standard G3PDH und **B** Produkte aus der RT-PCR-Analyse für CLC-K1 und CLC-K2 mit dem Standard  $\beta$ -Actin (in einem Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel). Untersucht wurden die linken Ventrikel (Herz LV) und die Nieren der Aortic-Banding-Ratten (AB) und der scheinoperierten Tiere (Sh).

## Ergebnisse

Abbildung 20 zeigt das Verhältnis der mRNA-Expression der Chloridkanäle CLC-2, CLC-3, CLC-4, CLC-6 und CLC-7 zu G3PDH im linken und rechten Ventrikel des Herzens bzw. das Verhältnis der mRNA-Expression von CLC-2 bis CLC-7 sowie CLC-K1 und CLC-K2 zu G3PDH bzw. zu  $\beta$ -Actin in der linken und rechten Niere nach 2 (siehe Abbildung 20A) oder 6 Wochen (siehe Abbildung 20B, folgende Seite).

### 2 Wochen nach AB

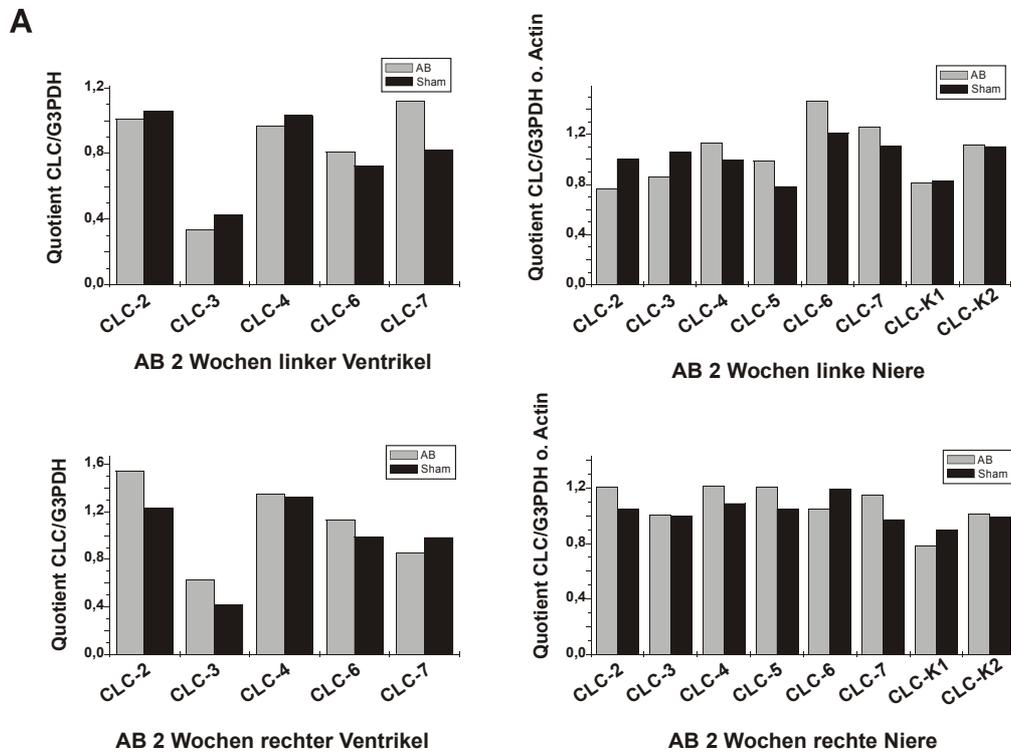


Abbildung 20A: Relative Signalintensität der CLC-Chloridkanäle im linken und rechten Ventrikel des Herzens bzw. in den linken und rechten Nieren 2 Wochen nach der Operation. Aortic-Banding-Ratten (AB; n = 4) sind mit grauen und die scheinoperierten Kontrollratten (Sham; n = 2) mit schwarzen Balken abgebildet.

**6 Wochen nach AB**

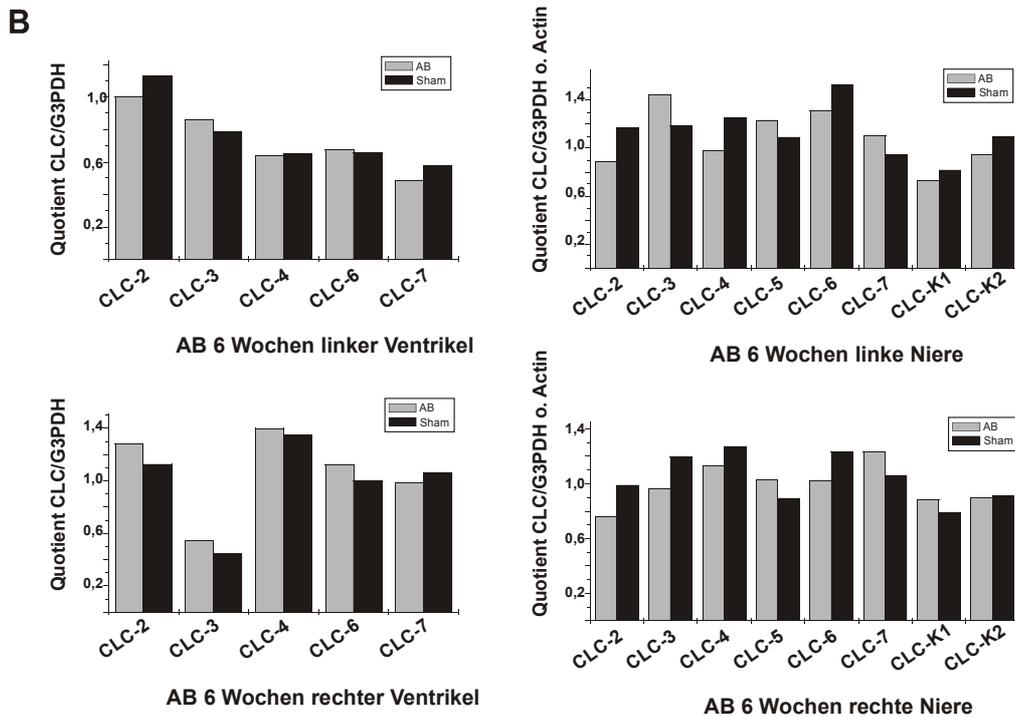


Abbildung 20B: Relative Signalintensität der CLC-Chloridkanäle im linken und rechten Ventrikel des Herzens bzw. in den linken und rechten Nieren 6 Wochen nach der Operation. Aortic-Banding-Ratten (AB; n = 4) sind mit grauen und die scheinoperierten Kontrollratten (Sham; n = 2) mit schwarzen Balken abgebildet.

Weder 2 noch 6 Wochen nach der Operation konnte eine Veränderung in der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle in den hypertrophierten Ventrikeln und in den Nieren im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren beobachtet werden. Es wurde auch keine Abweichung in der RNA-Expression in der linken im Vergleich zur rechten Niere festgestellt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle im Herzen und in der Niere der analysierten Tiermodelle mit den Krankheitsbildern Bluthochdruck und kardiale Hypertrophie im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert blieb. In den Tiermodellen der spontan hypertensiven Ratte und der SH-stroke-prone-Ratte, die genetisch bedingt Hypertonie oder Hypertrophie entwickeln, wurde keine veränderte mRNA-Expression festgestellt. Auch im Modell der salz-sensitiven Dahl-Ratte, in dem erst nach Verabreichung einer salzhaltigen Diät das Krankheitsbild entsteht, konnte keine Änderung der Expression beobachtet werden. Dasselbe ergab sich für das Aortic-Banding-Modell, in dem die Ratten nach einem operativen Eingriff einen Renin-abhängigen Bluthochdruck zeigen.

### **3.2 Herzinsuffizienz und die Genexpression der CLC-Chloridkanäle**

Die Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Meist steht im Mittelpunkt der Verlust von Herzmuskulatur und deren Ersatz durch Bindegewebe. Parallel zu der zunächst kompensatorischen kardialen Hypertrophie kommt es zu einer stetigen Zunahme der Kollagenmatrix. Störungen auf biochemischer Ebene führen zu anatomischen Veränderungen des Herzens und letztlich zur Einschränkung der Kontraktilität. Mit Hilfe eines Rattenmodells wurde die mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle im Herzen und in der Niere der kranken Tiere im Vergleich zu scheinoperierten Kontrolltieren untersucht.

#### **3.2.1 Das Herzinsuffizienz-Modell in der Ratte**

Sechs Wochen nach der Ligatur der Koronararterie entwickeln die Ratten eine Herzinsuffizienz, die durch strukturelle und funktionelle Veränderungen im Herzen charakterisiert ist.

In Abbildung 21 sind einige repräsentative Northern Blots für die Chloridkanäle CLC-2 bis CLC-7 (siehe Abbildung 21A) und repräsentative Agarosegele mit Produkten aus der RT-PCR-Analyse für CLC-K1 und CLC-K2 (siehe Abbildung 21B) dargestellt. Die RNA wurde aus dem Herzen und den Nieren der herzinsuffizienten und scheinoperierten Ratten gewonnen.

## Herz und Niere

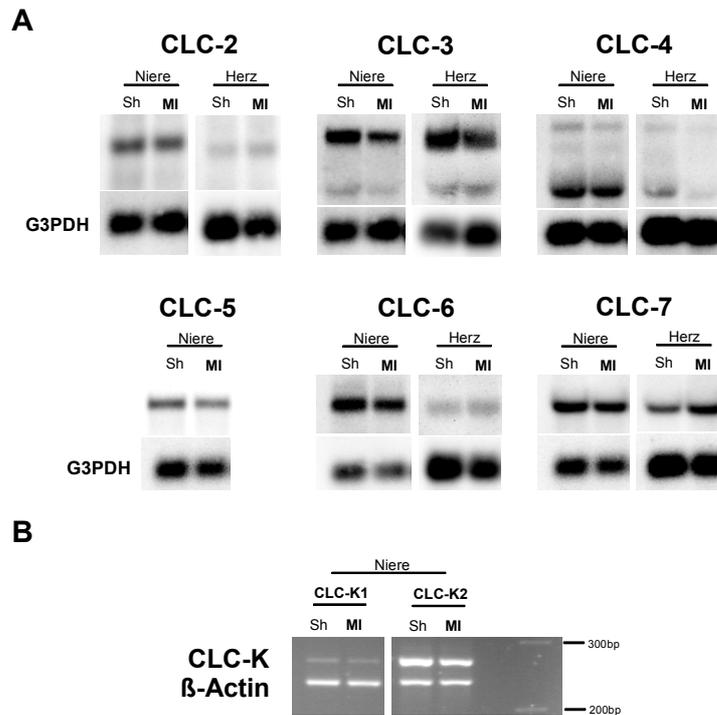


Abbildung 21: **A** Exemplarische Northern Blots für die Chloridkanäle CLC-2 bis CLC-7 und den Standard G3PDH und **B** Produkte aus der RT-PCR-Analyse für CLC-K1 und CLC-K2 mit dem Standard β-Actin in einem Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel abgebildet. Untersucht wurden das Herz und die Nieren von herzinsuffizienten Ratten nach einem Myokardinfarkt (MI) und scheinoperierten Ratten (Sh).

Das Verhältnis der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle zu G3PDH oder zu β-Actin im Herzen oder in der Niere wird in Abbildung 22 aufgezeigt. Weder im Herzen noch in der Niere der herzinsuffizienten Tiere wurden Unterschiede in der mRNA-Expression im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren beobachtet.

## Ergebnisse

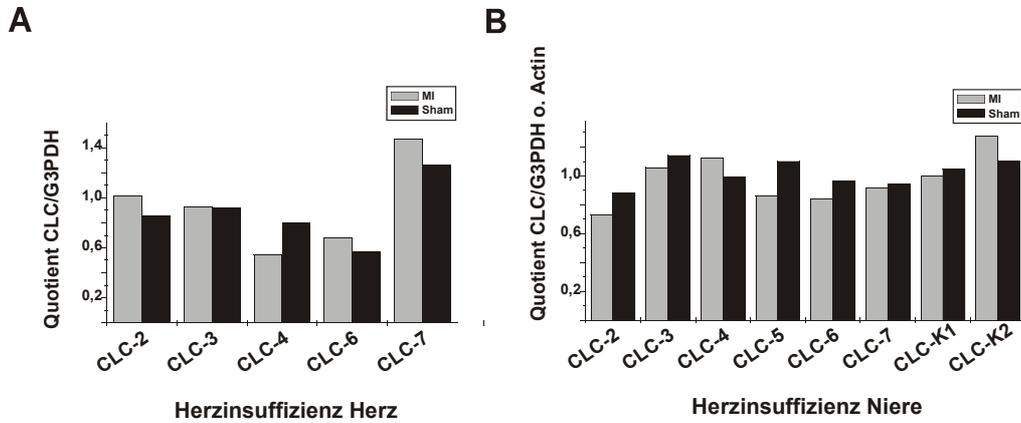


Abbildung 22: Relative Signalintensität der CLC-Chloridkanäle **A** im Herzen bzw. **B** in den Nieren. Ratten mit Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt (MI; n = 3) sind mit grauen und die scheinoperierten Kontrollratten (Sham; n = 3) mit schwarzen Balken abgebildet.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass die mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle im Tiermodell für die Herzinsuffizienz, in welchem die Ratten durch die Ligatur der Koronararterie einen Herzinfarkt bekommen, weder im Herzen noch in der Niere der Ratten im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren verändert wurde.

### **3.3 Niereninsuffizienz und die Genexpression der CLC-Chloridkanäle**

Eine akute Unterbrechung der renalen Blutversorgung, gefolgt von einer erneuten Durchblutung, ist eine häufig vorkommende klinische Situation, welche oft mit einer schweren Dysfunktion der Nieren verbunden ist. In diesem Abschnitt wird die Untersuchung der mRNA-Expression von CLC-Chloridkanälen in zwei Tierstudien mit Hilfe eines Rattenmodells für die Niereninsuffizienz beschrieben. In der ersten Studie wurde die mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle in niereninsuffizienten Ratten untersucht. In der zweiten Studie wurde dann die mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle in niereninsuffizienten Ratten analysiert, die entweder mit einer bei Niereninsuffizienz wirksamen Substanz oder mit Placebo behandelt wurden.

#### **3.3.1 Das Niereninsuffizienz-Modell in der Ratte: Studie I**

In der ersten Tierstudie wurden 20 Ratten operiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe enthielt Tiere, die nach akutem Nierenversagen eine Niereninsuffizienz entwickeln und die zweite Gruppe bestand aus scheinoperierten Ratten. Zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach dem Eingriff (8, 24, 32 Stunden und 7 Tage) wurden die Nieren der Tiere entnommen und in Nierenmark (Medulla) und Nierenrinde (Cortex) getrennt. Anschließend wurde die daraus isolierte RNA untersucht. Den Tieren wurde nach 8, 24, 32 Stunden oder 7 Tagen Blut abgenommen, um die klinischen Parameter wie Kreatinin- und Harnstoffspiegel zu bestimmen. In Abbildung 23 sind die Kreatinin- und Harnstoffwerte der niereninsuffizienten und scheinoperierten Tiere dargestellt. Sie dienen als Indikator für das Ausmaß der Niereninsuffizienz. Nur Tiere mit einem Kreatininwert größer als 150  $\mu\text{mol/l}$ , 24 Stunden nach dem Eingriff, wurden als niereninsuffizient betrachtet und in die Studie aufgenommen.

Bereits 8 Stunden nach der Ischämie wurde bei den niereninsuffizienten Tieren ein deutlicher Anstieg der Kreatininwerte auf das Vierfache beobachtet. Nach 24 bzw. 32 Stunden wurden die Spitzenwerte erreicht, die bis um das Zehnfache höher waren als bei den scheinoperierten Tieren. Nach 7 Tagen waren die Werte fast wieder auf dem normalen Niveau der scheinoperierten Tiere. Die Harnstoffwerte der niereninsuffizienten Tiere verhielten sich ähnlich wie die Kreatininwerte: Sie waren nach 8 Stunden auf das Doppelte und nach 24 bzw. 32 Stunden auf das Fünffache angestiegen. Nach 7 Tagen befanden sich die Werte fast wieder auf dem Niveau der scheinoperierten Tiere.

## Ergebnisse

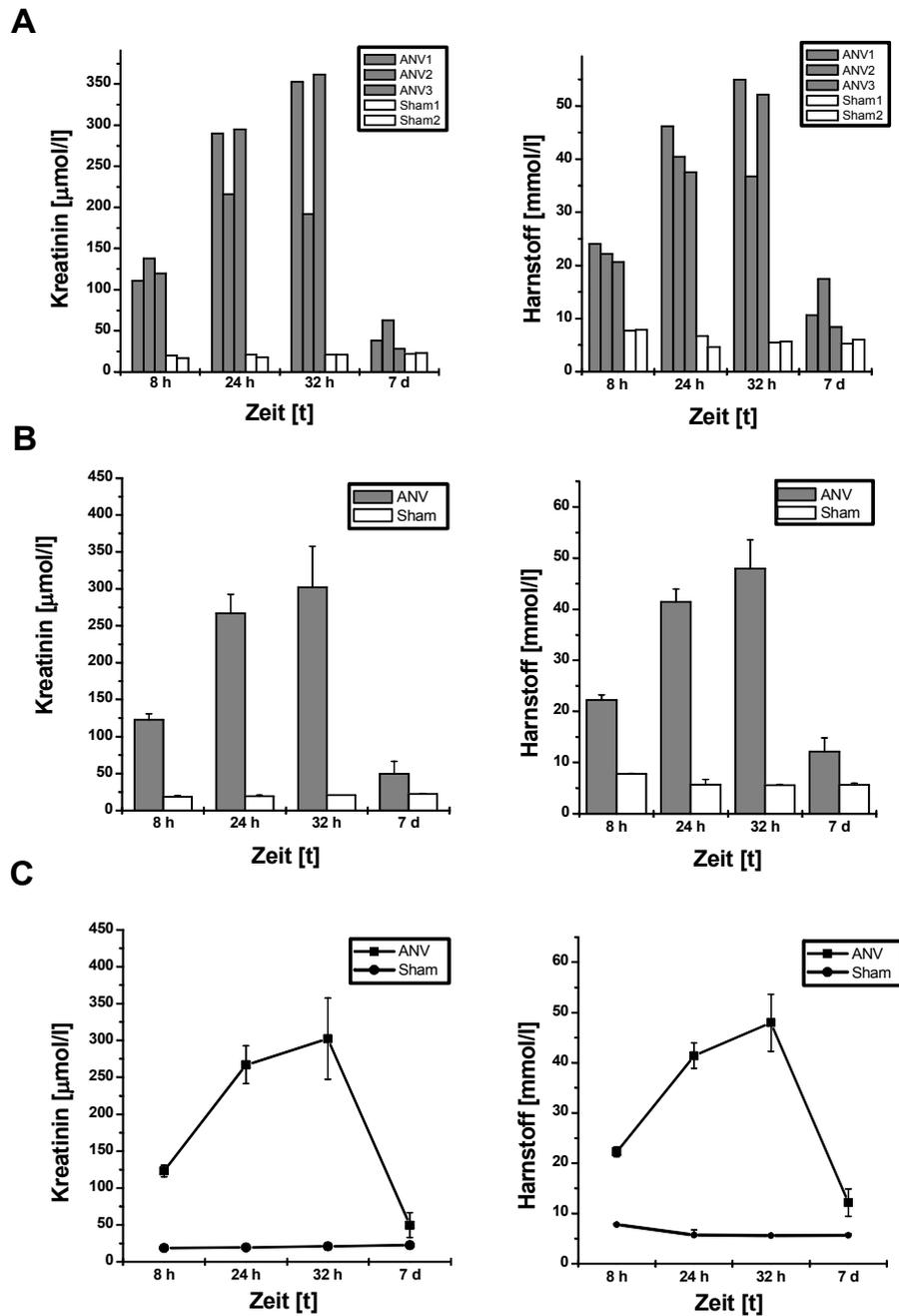


Abbildung 23: Kreatinin- und Harnstoffspiegel der Ratten mit Niereninsuffizienz nach akutem Nierenversagen (ANV, graue Balken) und der scheinoperierten Ratten (Sham, weiße Balken) bei vier verschiedenen Zeitpunkten. Es sind **A** die Werte der Einzeltiere und **B** die Werte der jeweiligen Tiergruppen als Balkendiagramme abgebildet. **C** zeigt den Verlauf als Kurve.

## Ergebnisse

Um die RNA-Expression der CLC-Chloridkanäle zu veranschaulichen, sind in Abbildung 24 zwei repräsentative Northern Blots für die Chloridkanäle CLC-4 und CLC-5 abgebildet. Hierbei ist ein Unterschied in der Signalintensität für die Tiere mit Niereninsuffizienz im Vergleich zu den Kontrolltieren ersichtlich.

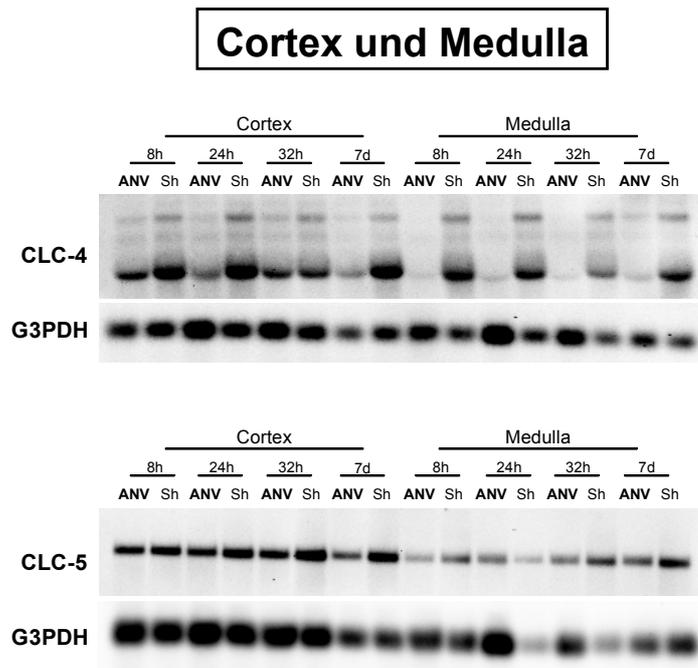


Abbildung 24: Repräsentative Northern Blots für die CLC-Chloridkanäle CLC-4, CLC-5 und den Standard G3PDH. Untersucht wurden Cortex und Medulla von niereninsuffizienten Tieren nach akutem Nierenversagen (ANV) und scheinoperierten Ratten (Sh).

Die RNA-Expressionsanalyse ergab eine verminderte mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle im Cortex und in der Medulla, wobei dieser Effekt in der Medulla oftmals noch stärker ausgeprägt war. Die Abnahme war bereits nach 8 Stunden zu beobachten und erreichte oft nach 24 bzw. 32 Stunden ihren Tiefstand. Nach 7 Tagen kehrten die Expressionswerte wieder in Richtung Normalzustand zurück. In Abbildung 25 sind die Expressionsdaten für die einzelnen CLC-Chloridkanäle dargestellt.

Die RNA-Signalwerte des Chloridkanals **CLC-2** waren in der niereninsuffizienten Ratte sowohl in der Medulla als auch im Cortex massiv vermindert, zum Beispiel nach 24 Stunden um ca. 90% im Vergleich zu den Expressionswerten des Kontrolltieres. Nach 7 Tagen waren die Werte noch um ca. 40% im Cortex bzw. 10% in der Medulla herabgesetzt.

## Ergebnisse

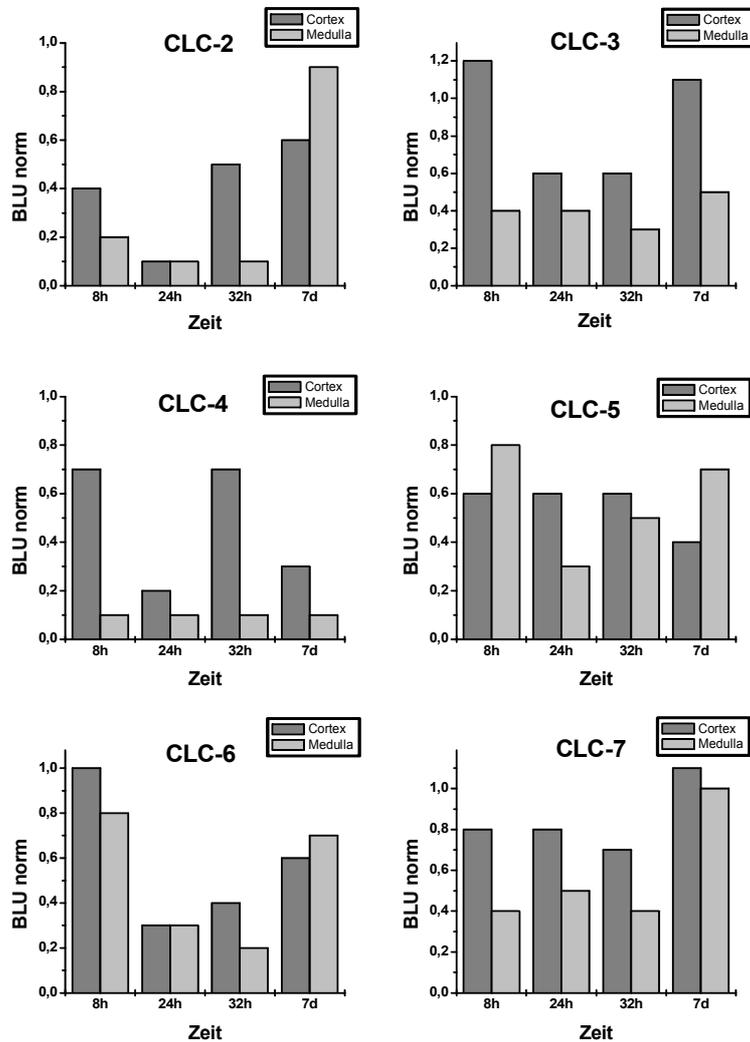


Abbildung 25: mRNA-Expressionswerte der Chloridkanäle CLC-2 bis CLC-7, die mit gepoolter RNA aus Cortex und Medulla erstellt wurden. Die Messwerte sind bezogen auf die Kontrolltiere (n = 2) normiert (BLU norm, y-Achse) und gegen die Zeitabschnitte aufgetragen (x-Achse). Die Werte der niereninsuffizienten Tiere (n = 3) sind für den Cortex mit dunkelgrauen und für die Medulla mit hellgrauen Balken abgebildet.

Die mRNA-Expressionswerte von **CLC-3** waren in der Medulla bereits nach 8 Stunden und im Cortex nach 24 Stunden deutlich um 40-60% bezüglich der Kontrollwerte verringert. Nach 7 Tagen waren die Werte im Cortex wieder normal, in der Medulla hingegen noch immer um ca. 50% vermindert.

## Ergebnisse

Eine drastische Abnahme der mRNA-Expressionswerte in der Medulla war bei **CLC-4** zu beobachten. Dort waren die Werte um ca. 90% im Vergleich zu den Kontrolltieren während des gesamten Versuchsverlaufs herabgesetzt. Im Cortex hingegen waren sie um 30-80% vermindert.

Die mRNA-Expressionswerte des Chloridkanals **CLC-5** nahmen im Cortex um ca. 40% zu jedem untersuchten Zeitpunkt ab. In der Medulla sah man allerdings einen Abfall der Werte nach 8 Stunden um ca. 20%, nach 24 Stunden um ca. 70%, nach 32 Stunden um ca. 50% und nach 7 Tagen um noch ca. 30%.

Bei **CLC-6** war ein ähnlicher erst ab- und dann wieder zunehmender Verlauf bei den Werten in Medulla und Cortex zu beobachten. Die Werte waren hier im Vergleich zu den Kontrolltieren um 20-80% verringert.

Die Werte von **CLC-7** waren im Cortex um ca. 20% und in der Medulla um 50-60% in dem Zeitraum zwischen 8 und 32 Stunden reduziert. Nach 7 Tagen hatten die Werte in Cortex und Medulla wieder das Niveau der Kontrolltiere erreicht.

In Abbildung 26 sind die mRNA-Expressionswerte für die RT-PCR-Analyse der Chloridkanäle CLC-K1 und CLC-K2 dargestellt. CLC-K1 wurde aufgrund seines Vorkommens im dünnen aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife nur in der Medulla analysiert.

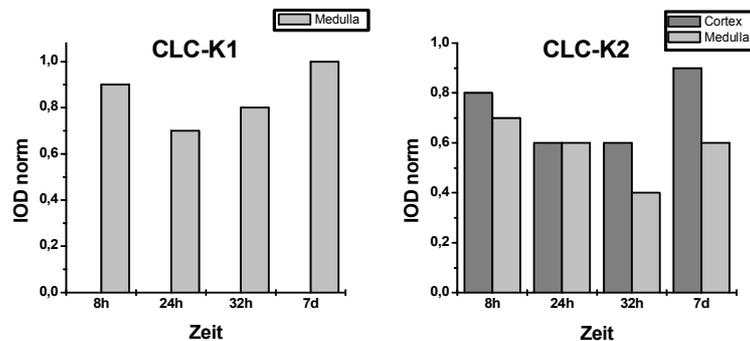


Abbildung 26: Verlauf der Genexpression der Chloridkanäle CLC-K1 und CLC-K2, die durch RT-PCR-Analyse mit gepoolter RNA aus Cortex und Medulla erstellt wurden. Die Messwerte sind auf die Werte der Kontrolltiere ( $n = 2$ ) normiert (IOD norm, y-Achse) und gegen die Zeit aufgetragen (x-Achse). Die Werte der niereninsuffizienten Tiere ( $n = 3$ ) sind im Cortex mit dunkelgrauen und in der Medulla mit hellgrauen Balken abgebildet.

## Ergebnisse

---

Die Abnahme der mRNA-Expressionswerte von CLC-K1 und CLC-K2 war nicht so drastisch wie die der anderen CLC-Chloridkanäle. Die maximale Reduktion der Expressionswerte für **CLC-K1** in der Medulla betrug nach 24 Stunden ca. 30% im Vergleich zu den Kontrolltieren. Nach 7 Tagen waren die Werte der Kontrolltiere wieder erreicht.

Bei **CLC-K2** waren die mRNA-Expressionswerte in der Medulla bzw. im Cortex um 20-60% bezüglich der Kontrolltiere verringert.

In der ersten Studie des Niereninsuffizienz-Modells, bei welchem die Ratten nach akutem Nierenversagen durch Abklemmen der renalen Venen und Arterien eine Niereninsuffizienz entwickelten, wurden 20 Tiere operiert und sowohl Cortex als auch Medulla analysiert. Die mRNA-Expressionsanalyse ergab für alle untersuchten CLC-Chloridkanäle, CLC-2 bis CLC-7 sowie CLC-K1 und CLC-K2, eine Abnahme der mRNA-Expression, die innerhalb der ersten 32 Stunden nach der Operation am stärksten war und nach 7 Tagen wieder in Richtung Kontrollniveau anstieg. Oftmals war eine größere Abnahme der mRNA-Expression in der Medulla im Vergleich zum Cortex zu beobachten.

### 3.3.2 Validierung durch die Genexpression von NHE-3

Eine Abnahme der mRNA-Expression des Natrium-Protonen-Austauschers (NHE-3) um 75% in Cortex und Medulla von niereninsuffizienten Ratten nach 12 bzw. 24 Stunden wurde in einer Studie beschrieben (Wang *et al.*, 1997). Deshalb wurde NHE-3 in unserer Studie als Positiv-Kontrolle für die mRNA-Expression verwendet. Auch in unserem Versuch wurde eine Abnahme der mRNA-Expression von NHE-3 bei den niereninsuffizienten Tieren im Northern Blot um 60-80% innerhalb der ersten 32 Stunden und um 50-70% nach 7 Tagen beobachtet (siehe Abbildung 27). Damit wurden sowohl die Ergebnisse der oben genannten Studie bestätigt und zum anderen auch das verwendete Niereninsuffizienz-Modell validiert.

## Ergebnisse

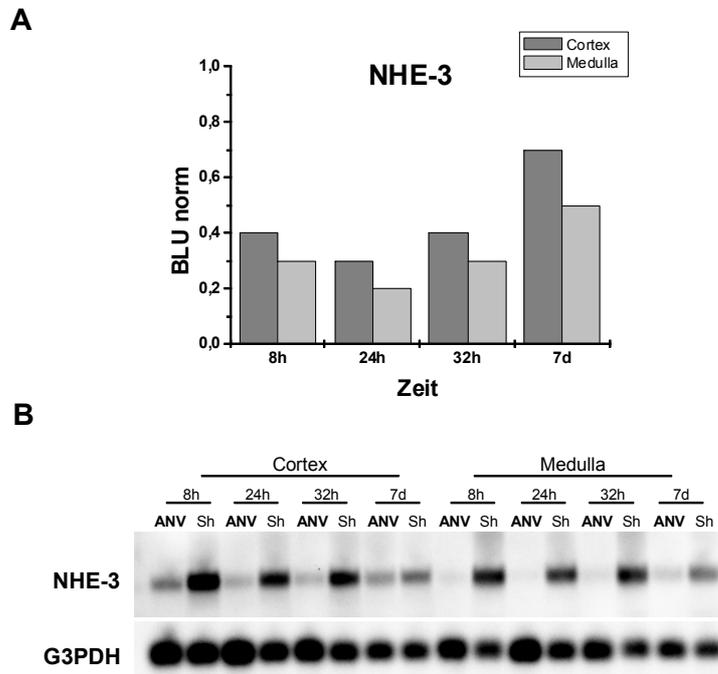


Abbildung 27: **A** mRNA-Expression des NHE-3 als Balkendiagramm. Die Messwerte sind auf die Kontrolltiere normiert (BLU norm, y-Achse) und gegen die Zeit aufgetragen (x-Achse). Die Werte der niereninsuffizienten Tiere sind im Cortex mit dunkelgrauen und in der Medulla mit hellgrauen Balken abgebildet. Bei **B** ist ein Beispiel für eine Northern Blot-Analyse gezeigt, die mit gepoolter RNA aus Cortex und Medulla von niereninsuffizienten Tieren (ANV; n = 3) und scheinoperierten Kontrollratten (Sh; n = 2) durchgeführt wurde.

Mit Hilfe der mRNA-Expression von NHE-3 konnten die in diesem Tiermodell für die CLC-Chloridkanäle erzielten Ergebnisse validiert werden. Wie in der Literatur beschrieben, wurde eine Reduktion der mRNA-Expression beobachtet. Damit ist es möglich, die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Daten für die CLC-Chloridkanal-Genexpression mit den in der Literatur am gleichen Tiermodell bereits beschriebenen Resultaten zu vergleichen.

### 3.3.3 Einfluss der NHE-3-Blockade auf die Genexpression der CLC-Chloridkanäle: Studie II

Frühere Studien haben gezeigt, dass die Behandlung von niereninsuffizienten Ratten mit einem NHE-3-Inhibitor zu einem verringerten Anstieg der Kreatininwerte und einer verbesserten Überlebensrate der Tiere führt (Hropot *et al.*, 1998 und *in Druck*). Um den Zusammenhang zwischen der Abnahme der RNA-Expression und dem Verlauf der Niereninsuffizienz zu untersuchen und um die Ergebnisse der ersten Studie zu bestätigen, wurde eine zweite Tierstudie durchgeführt. In diesem Versuch wurden die Tiere über einen längeren Zeitraum beobachtet, und eine Gruppe der niereninsuffizienten Tiere wurde mit dem NHE-3-Hemmer S3226 behandelt. Insgesamt wurden 41 Ratten operiert und in drei Gruppen aufgeteilt: in Ratten mit Niereninsuffizienz, die entweder mit S3226 oder mit Placebo zu Beginn der Reperfusion behandelt wurden, sowie in scheinoperierte Ratten. Nach fünf verschiedenen Zeitabschnitten, nämlich nach 8, 24, 32 Stunden sowie 7 und 14 Tagen, wurden Medulla und Cortex der Tiere analysiert.

In Abbildung 28 sind die Kreatinin- und Harnstoffwerte der mit Placebo und S3226 behandelten niereninsuffizienten Ratten im Vergleich zu den Werten der scheinoperierten Tiere dargestellt. Auch in dieser Studie dienten diese Werte als Marker für das Ausmaß der erzielten Niereninsuffizienz. Ein Kreatininwert größer als 150  $\mu\text{mol/l}$  24 Stunden nach dem akuten Nierenversagen galt als Voraussetzung für die Aufnahme der Tiere in die Studie. Ein deutlicher Anstieg der Kreatininwerte auf das Vier- bis Fünffache wurde bei den niereninsuffizienten Tieren bereits nach 8 Stunden beobachtet. Nach 24 bzw. 32 Stunden wurden die höchsten Werte erreicht, die bei den niereninsuffizienten Ratten zehn- bis vierzehnmal so hoch waren wie bei den scheinoperierten Tieren. Nach 7 bzw. 14 Tagen waren die Werte wieder auf dem Niveau der scheinoperierten Kontrollratten angelangt. Die Harnstoffwerte verhielten sich ähnlich. Sie waren nach 8 Stunden auf das Doppelte und nach 24 bzw. 32 Stunden auf das Fünffache angestiegen. Nach 7 bzw. 14 Tagen waren die Werte auf das Niveau der scheinoperierten Ratten zurückgekehrt.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass der Verlauf der Kreatinin- und Harnstoffwerte der niereninsuffizienten und scheinoperierten Tiere aus der zweiten Studie mit dem der ersten Studie übereinstimmte (siehe Abbildung 23). Zwischen den mit Placebo und den mit S3226 behandelten niereninsuffizienten Tieren konnte kein signifikanter Unterschied in den Kreatinin- bzw. Harnstoffspiegeln nachgewiesen werden.

## Ergebnisse

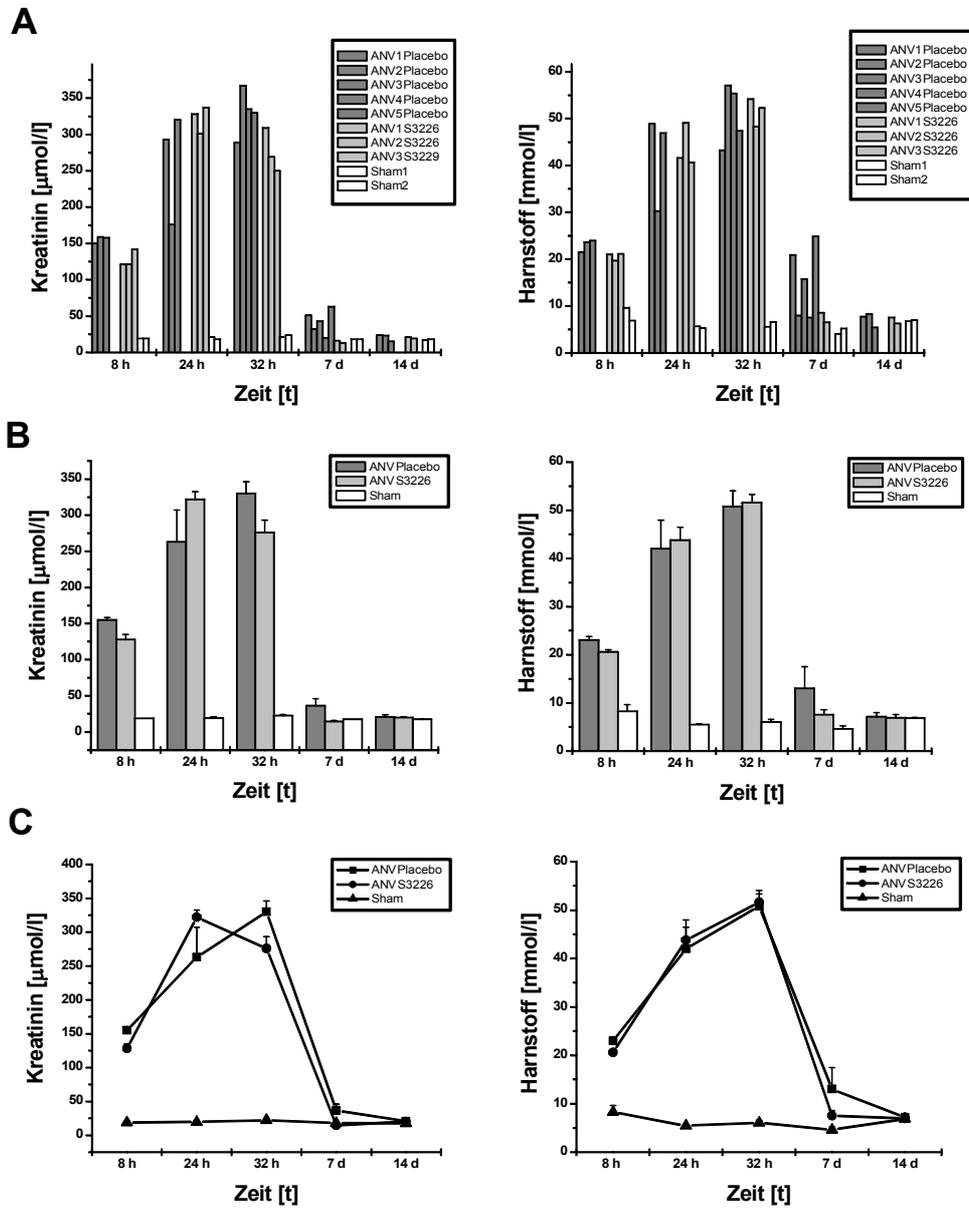


Abbildung 28: Kreatinin- und Harnstoffspiegel der Ratten mit Niereninsuffizienz nach akutem Nierenversagen (ANV), die entweder mit Placebo (dunkelgraue Balken) oder mit S3226 (hellgraue Balken) behandelt wurden, und die der scheinoperierten Ratten (Sham, weiße Balken) zu fünf verschiedenen Zeitpunkten. Bei **A** sind die Werte der Einzeltiere und bei **B** die Werte der Gruppen als Balkendiagramme abgebildet. **C** zeigt den Verlauf als Kurve.

## Ergebnisse

Um zu bestätigen, dass die nach 7 oder 14 Tagen analysierten Tiere, bei denen die Kreatinin- und Harnstoffwerte identisch waren mit denen der Kontrolltiere, auch tatsächlich zuvor niereninsuffizient waren, wurden die Kreatinin- und Harnstoffspiegel dieser Tiere auch nach 24 Stunden überprüft. In Abbildung 29 sind die Werte der Tiere, die nach 7 Tagen und in Abbildung 30 die Werte der Tiere, die nach 14 Tagen analysiert wurden, dargestellt. Es wurde der erwartete Verlauf mit einem drastischen Anstieg nach 24 Stunden und eine Normalisierung der Werte nach 7 bzw. 14 Tagen beobachtet.

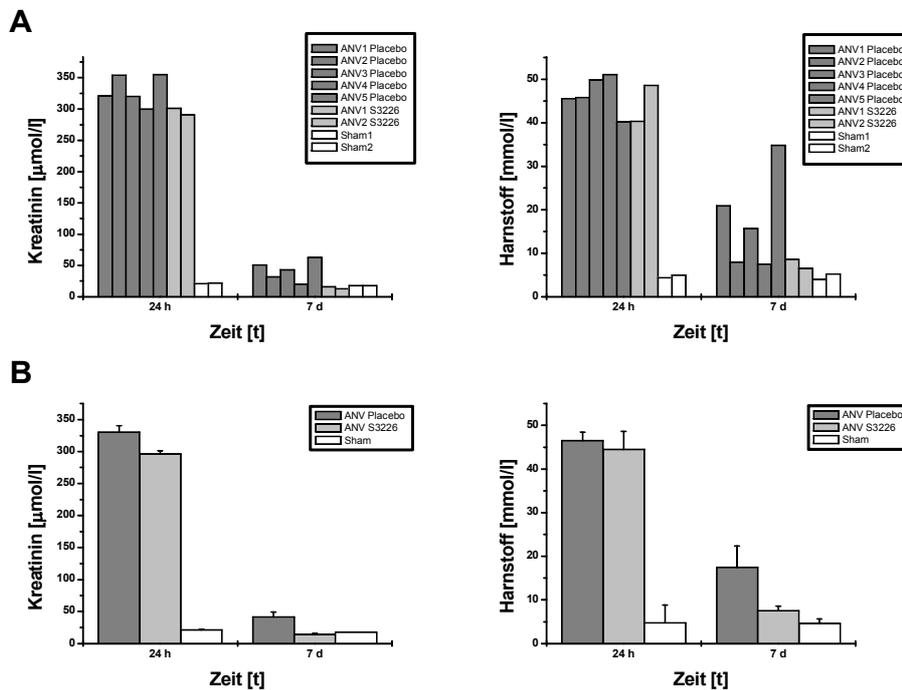


Abbildung 29: Kreatinin- und Harnstoffspiegel der Ratten mit Niereninsuffizienz (ANV) 7 Tage nach der Operation, die entweder mit Placebo (dunkelgraue Balken) oder mit S3226 (hellgraue Balken) behandelt wurden, und die der scheinoperierten Ratten (Sham, weiße Balken). **A** zeigt die Werte der Einzeltiere und **B** die Werte der Tiere als Gruppe zusammengefasst.

## Ergebnisse

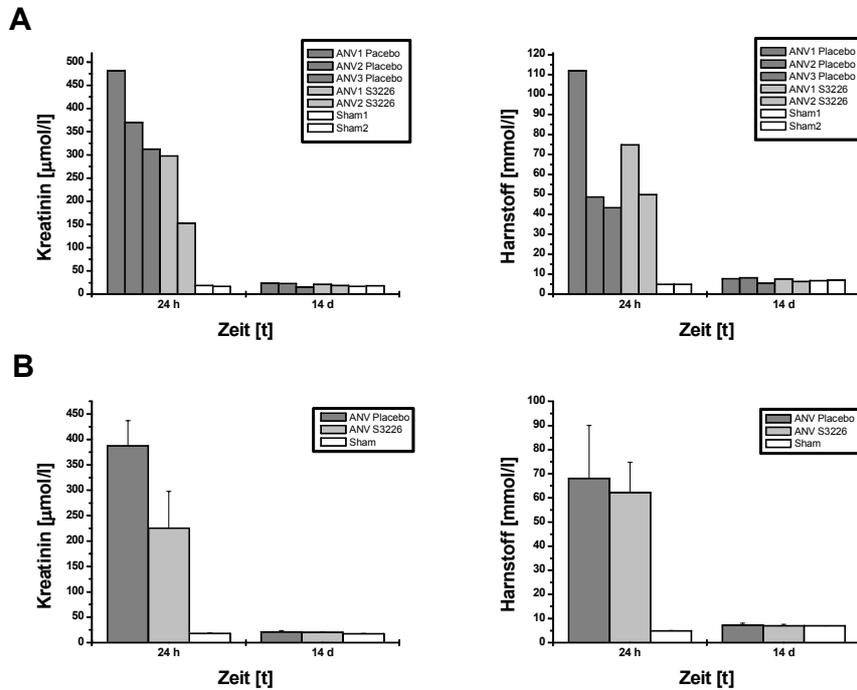


Abbildung 30: Kreatinin- und Harnstoffspiegel der Ratten mit Niereninsuffizienz (ANV) 14 Tage nach der Operation, die entweder mit Placebo (dunkelgraue Balken) oder mit S3226 (hellgraue Balken) behandelt wurden, und die der scheinoperierten Ratten (Sham, weiße Balken). **A** zeigt die Werte der Einzeltiere und **B** die Werte der Tiere als Gruppe zusammengefasst.

In Abbildung 31 ist das Resultat einer repräsentativen Northern Blot-Analyse, die mit RNA aus dem Cortex durchgeführt wurde, am Beispiel von CLC-7 abgebildet. Eine Abnahme der Signalintensität von CLC-7 im Verlauf der Niereninsuffizienz ist deutlich erkennbar.

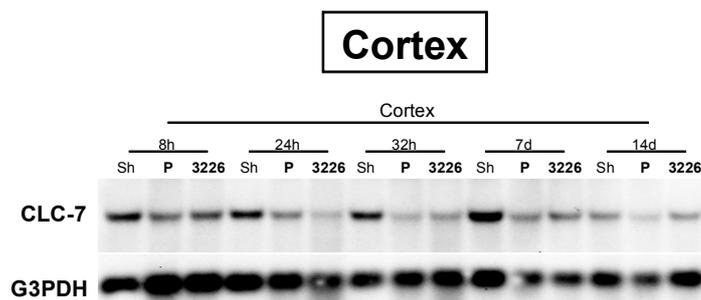


Abbildung 31: Northern Blot-Analyse von CLC-7 und dem Standard G3PDH. Untersucht wurde die RNA aus dem Cortex von niereninsuffizienten Tieren, die mit Placebo (P) oder S3226 (3226) behandelt wurden, und von scheinoperierten Ratten (Sh).

## Ergebnisse

In Abbildung 32 sind die mRNA-Expressionsdaten der Northern Blot-Analysen, die mit RNA aus dem Cortex der niereninsuffizienten und scheinoperierten Tiere hergestellt wurden, für die CLC-Chloridkanäle CLC-2 bis CLC-7 dargestellt. Insgesamt konnte man feststellen, dass mit der Gabe von S3226 keine Verbesserung der RNA-Expressionswerte zu beobachten war. Der zeitliche Verlauf der Abnahme der mRNA-Expressionsdaten stimmte mit dem aus der ersten Studie überein. Damit konnten die in der ersten Studie festgestellten Veränderungen in der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle bestätigt werden.

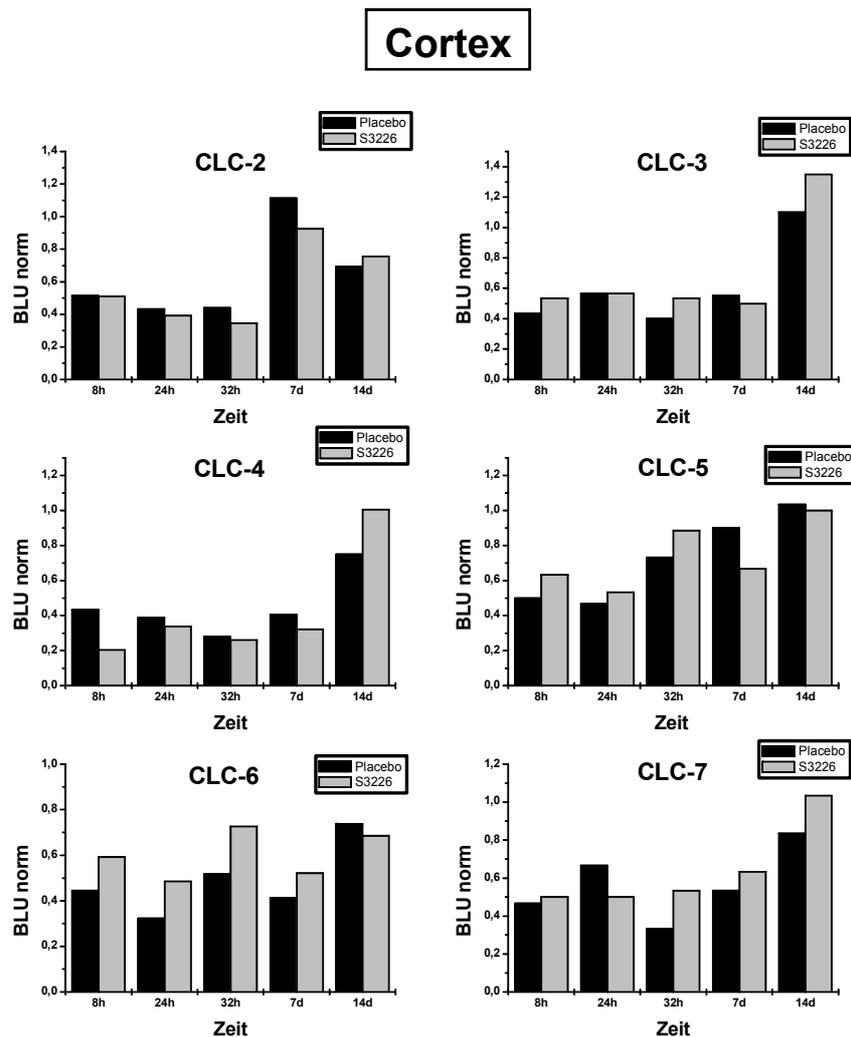


Abbildung 32: mRNA-Expressionswerte der Chloridkanäle CLC-2 bis CLC-7, die mit gepoolter RNA aus dem Cortex generiert wurden. Die Messwerte sind auf die Kontrolltiere ( $n = 2$ ) normiert (BLU norm, y-Achse) und gegen die Zeit aufgetragen (x-Achse). Die Werte der niereninsuffizienten Tiere sind für die mit Placebo behandelten Tiere ( $n = 3-4$ ) mit schwarzen und die mit S3226 behandelten Tiere ( $n = 2-3$ ) mit grauen Balken abgebildet.

## Ergebnisse

In Tabelle 4 wird die prozentuale Abnahme der mRNA-Expression in den mit Placebo behandelten niereninsuffizienten Tieren aus der Studie II mit der in den niereninsuffizienten Tieren aus der Studie I verglichen.

Tabelle 4: Vergleich der veränderten Genexpression zwischen Studie I und Studie II: Die Abnahme der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle im Cortex der niereninsuffizienten Ratten bezüglich der Kontrolltiere ist in % dargestellt.

Kanal	Studie	8h	24h	32h	7d
<b>CLC-2</b>	Studie I	60	90	50	40
	Studie II	50	60	60	0
<b>CLC-3</b>	Studie I	0	40	40	0
	Studie II	60	50	60	50
<b>CLC-4</b>	Studie I	30	80	30	70
	Studie II	60	60	70	60
<b>CLC-5</b>	Studie I	40	40	40	60
	Studie II	50	50	30	10
<b>CLC-6</b>	Studie I	0	70	60	40
	Studie II	60	70	50	60
<b>CLC-7</b>	Studie I	20	20	30	0
	Studie II	50	30	60	50
<b>CLC-K2</b>	Studie I	20	40	40	10
	Studie II	30	40	30	10

Die mRNA-Expressionswerte des Chloridkanals **CLC-2** waren in niereninsuffizienten Ratten innerhalb der ersten 32 Stunden um 50-60% im Vergleich zu den Kontrolltieren herabgesetzt. Nach 7 bzw. 14 Tagen hatten die Werte der niereninsuffizienten Tiere aber wieder ungefähr die Kontrollwerte erreicht. Diese Tendenz entspricht den Werten aus der ersten Studie (siehe Tabelle 4).

Die Expressionswerte der mRNA von **CLC-3** waren im Laufe der ersten 7 Tage um 50-60% im Vergleich zu den Kontrollwerten verringert. Nach 14 Tagen waren die Werte wieder normalisiert. In der ersten Studie war die Abnahme erst nach 24 Stunden deutlich zu erkennen und die Werte waren bereits nach 7 Tagen wieder auf normalem Niveau (siehe Tabelle 4).

Beim Chloridkanal **CLC-4** war ein ähnlicher Verlauf zu beobachten. Die mRNA-Expressionswerte sanken um 60-80% im Vergleich mit den Kontrolltieren im Zeitraum von 8 Stunden bis zu 7 Tagen. Nach 14 Tagen kehrten sie in Richtung Normalzustand zurück. Die beobachteten Expressionsdaten stimmen mit denen aus der ersten Studie überein (siehe Tabelle 4).

Die mRNA-Expressionswerte des **CLC-5** nahmen um 40-70% ab und erreichten nach 14 Tagen wieder das Niveau der Kontrolltiere. Bei der mRNA-Expression von **CLC-6** war ein ähnlicher Verlauf bei den Werten zu verzeichnen. Die Werte waren hier im Vergleich zu den Kontrolltieren um 20-70% verringert und erreichten ebenfalls nach 14 Tagen wieder fast die

## Ergebnisse

entsprechenden Kontrollwerte. Für CLC-5 und CLC-6 wurden somit die Werte aus der ersten Studie bestätigt (siehe Tabelle 4).

Auch für die mRNA-Expressionswerte des **CLC-7** ergab sich ein ähnliches Bild mit einer Abnahme um 30-60% und einer Rückkehr zum Ausgangsniveau nach 14 Tagen. Die Abnahme war in dieser Studie etwas früher und stärker als in der ersten Studie zu beobachten (siehe Tabelle 4).

In Abbildung 33 sind drei Northern Blots, die mit RNA aus der Medulla hergestellt wurden, dargestellt. Eine Abnahme der Signalintensität der RNA von CLC-3, CLC-5 und CLC-7 war bei den niereninsuffizienten Tieren im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren zu beobachten. Außerdem ist der Unterschied in der Signalintensität zwischen den mit S3226 und den mit Placebo behandelten Tieren nach 8 Stunden deutlich zu erkennen.

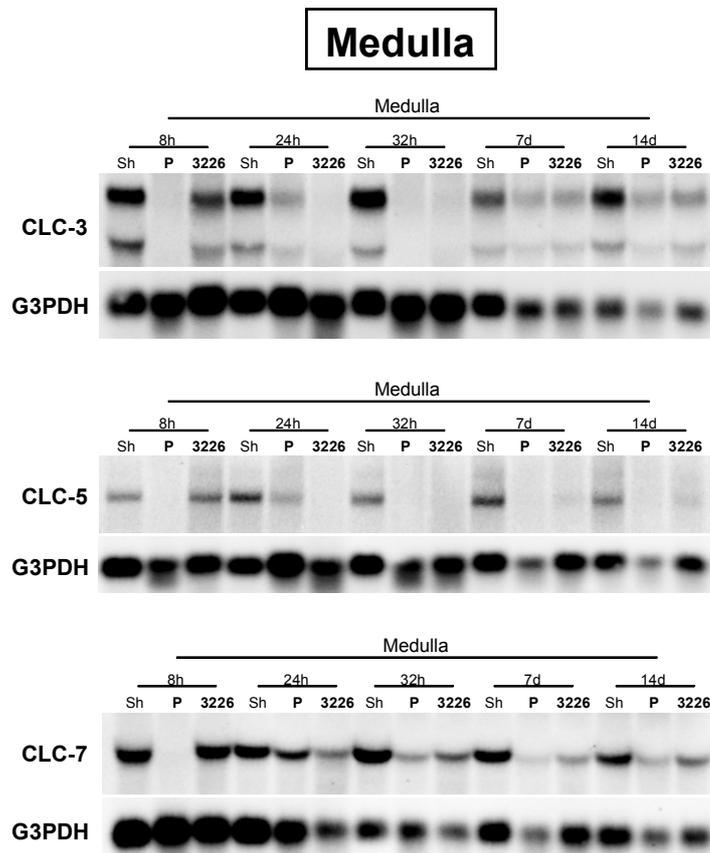


Abbildung 33: Drei repräsentative Northern Blot-Analysen für CLC-3, CLC-5 sowie CLC-7 und den Standard G3PDH. Untersucht wurde die RNA aus der Medulla von niereninsuffizienten Tieren, die mit Placebo (P) oder S3226 (3226) behandelt wurden, sowie von scheinoperierten Ratten (Sh).

## Ergebnisse

Die mRNA-Expressionswerte der Northern Blot-Analysen, die mit RNA aus der Medulla durchgeführt wurden, sind in Abbildung 34 dargestellt. Auch hier ergibt sich eine Übereinstimmung im Verlauf der mRNA-Expression mit der ersten Studie.

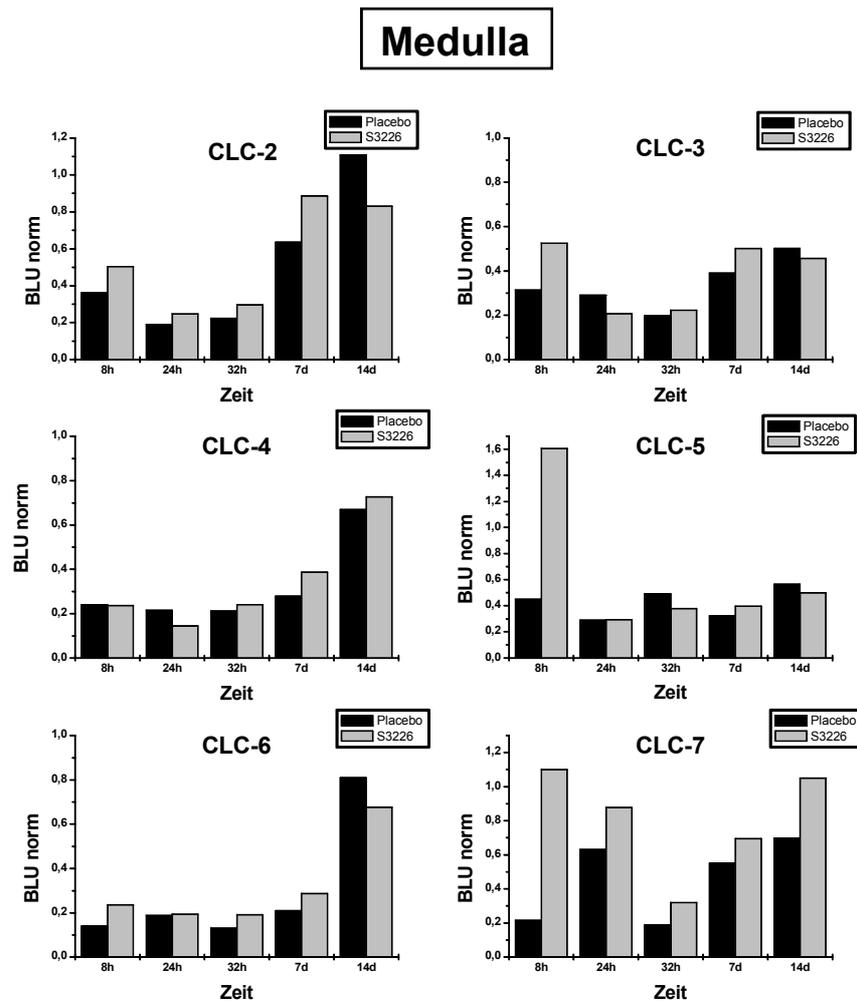


Abbildung 34: mRNA-Expressionswerte der Chloridkanäle CLC-2 bis CLC-7, die mit gepoolter RNA aus der Medulla erstellt wurden. Die Messwerte sind auf die Kontrolltiere (n = 2) normiert (BLU norm, y-Achse) und gegen die Zeit aufgetragen (x-Achse). Die Werte der niereninsuffizienten Tiere sind für die mit Placebo behandelten Tiere (n = 3-4) mit schwarzen und die mit S3226 behandelten Tiere (n = 2-3) mit grauen Balken abgebildet.

## Ergebnisse

Die in den Studien I und II beobachtete Reduktion der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle in der Medulla ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Vergleich der veränderten Genexpression zwischen Studie I und Studie II: Die Abnahme der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle in der Medulla der niereninsuffizienten Ratten bezüglich der Kontrolltiere ist in % dargestellt.

Kanal	Studie	8h	24h	32h	7d
<b>CLC-2</b>	Studie I	80	90	90	10
	Studie II	60	80	80	40
<b>CLC-3</b>	Studie I	60	60	70	50
	Studie II	70	70	80	60
<b>CLC-4</b>	Studie I	90	90	90	90
	Studie II	80	80	80	70
<b>CLC-5</b>	Studie I	20	70	50	30
	Studie II	60	70	50	60
<b>CLC-6</b>	Studie I	20	70	80	30
	Studie II	80	80	80	80
<b>CLC-7</b>	Studie I	60	50	60	0
	Studie II	80	40	80	40
<b>CLC-K1</b>	Studie I	10	30	20	0
	Studie II	40	60	70	20
<b>CLC-K2</b>	Studie I	30	40	60	40
	Studie II	40	40	40	30

Die mRNA-Expressionswerte des Chloridkanals **CLC-2** waren in den Ratten mit Niereninsuffizienz innerhalb der ersten 32 Stunden um 50-80% im Vergleich zu den Kontrolltieren herabgesetzt. Nach 7 Tagen waren sie noch um 20-40% vermindert, und nach 14 Tagen hatten die Werte wieder ungefähr das Niveau der Kontrollwerte erreicht. Dieselbe Tendenz war in der ersten Studie zu beobachten (siehe Tabelle 5).

Die mRNA-Expressionswerte von **CLC-3** waren während des ganzen Zeitraumes von 14 Tagen um 50-80% verringert, was mit den Werten aus der ersten Studie übereinstimmt. Nach 8 Stunden war eine stärkere Abnahme der Expression bei den mit Placebo im Vergleich zu den mit S3226 behandelten Tieren zu erkennen. Der Verlauf der Abnahme der mRNA-Expression von CLC-3 entsprach dem der ersten Studie (siehe Tabelle 5).

Die mRNA-Expressionswerte des Chloridkanals **CLC-4** waren während der ersten 7 Tage um 60-80% bezüglich der Kontrollwerte reduziert. Nach 14 Tagen war nur noch eine Abnahme um ca. 30% zu beobachten. Die Werte entsprachen denen der ersten Studie (siehe Tabelle 5).

Die mRNA-Expressionswerte von **CLC-5** nahmen um 50-70% ab und blieben 14 Tage lang auf diesem Niveau. Wie bei CLC-3 war nach 8 Stunden ein Unterschied zwischen den mit Placebo und den mit S3226 behandelten Tieren zu beobachten. Insgesamt betrachtet war die

## Ergebnisse

Abnahme der mRNA-Expression stärker als in der ersten Studie und änderte sich auch nicht nach einem längeren Zeitraum von 7 oder 14 Tagen (siehe Tabelle 5).

Bei **CLC-6** war im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Abnahme der mRNA-Expression um 70-80% zu sehen. Nach 14 Tagen erreichten die Werte wieder fast die entsprechenden Kontrollwerte. Für CLC-6 nahmen die Werte, verglichen mit der ersten Studie, schneller um 20-80% ab (nach 8 Stunden) und erholten sich erst etwas später wieder (nach 14 Tagen; siehe Tabelle 5).

Schließlich ergab sich für **CLC-7** eine Reduktion der mRNA-Expressionswerte um 20-80% innerhalb der ersten 7 Tage und ein Anstieg in Richtung Kontrollwerte nach 14 Tagen. Nach 8 Stunden war eine stärkere Abnahme der Expression bei den mit Placebo im Vergleich zu den mit S3226 behandelten Tieren, deren Werte zu diesem Zeitpunkt unverändert waren, zu beobachten. Der Verlauf der Abnahme der mRNA-Expression von CLC-7 war dem der ersten Studie sehr ähnlich (siehe Tabelle 5).

In Abbildung 35 werden repräsentative Agarosegele mit Produkten aus den RT-PCR-Analysen für CLC-K2 und  $\beta$ -Actin gezeigt, die mit RNA aus dem Cortex und aus der Medulla der niereninsuffizienten und scheinoperierten Tiere hergestellt wurden.

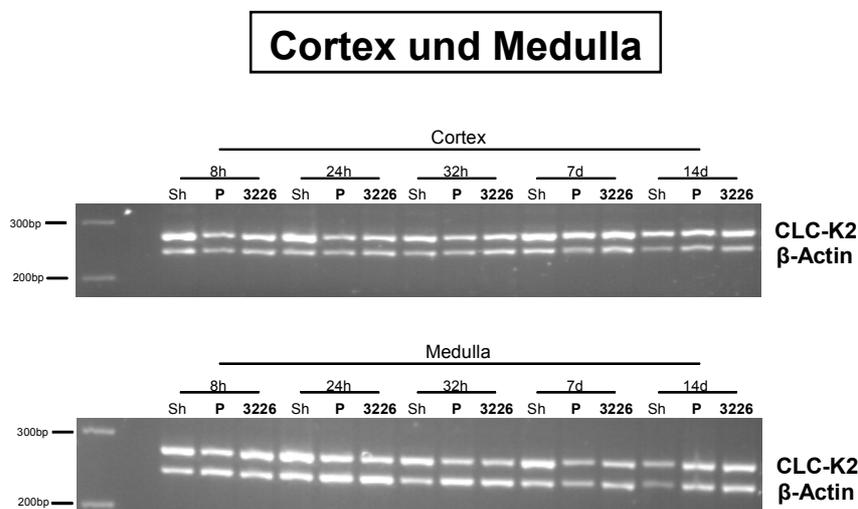


Abbildung 35: CLC-K2-Amplifikationsprodukte mit dem Standard  $\beta$ -Actin (in einem Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel). Untersucht wurden Cortex und Medulla der niereninsuffizienten Tiere, die mit Placebo (P) oder S3226 (3226) behandelt wurden, und der scheinoperierten Tiere (Sh).

## Ergebnisse

Die Werte für die mRNA-Expression der Chloridkanäle CLC-K1 und CLC-K2 in Cortex und Medulla wurden mit Hilfe der RT-PCR-Analyse gewonnen und sind in Abbildung 36 abgebildet. CLC-K1 wurde, wie bereits erwähnt, aufgrund seines Expressionsmusters nur in der Medulla untersucht.

Die mRNA-Expressionswerte von **CLC-K1** in der Medulla waren bei den niereninsuffizienten Tieren nach 8 Stunden im Vergleich zu den Kontrollwerten um ca. 40%, nach 24 Stunden um ca. 60% und nach 32 Stunden um ca. 70% reduziert. Nach 7 Tagen befanden sich die Werte wieder auf normalem Niveau, wohingegen sie nach 14 Tagen wieder etwas erniedrigt waren. Zwischen den mit Placebo und den mit S3226 behandelten Tieren war kein Unterschied zu erkennen. Der Verlauf der Abnahme der mRNA-Expression entsprach dem der ersten Studie (siehe Tabelle 5).

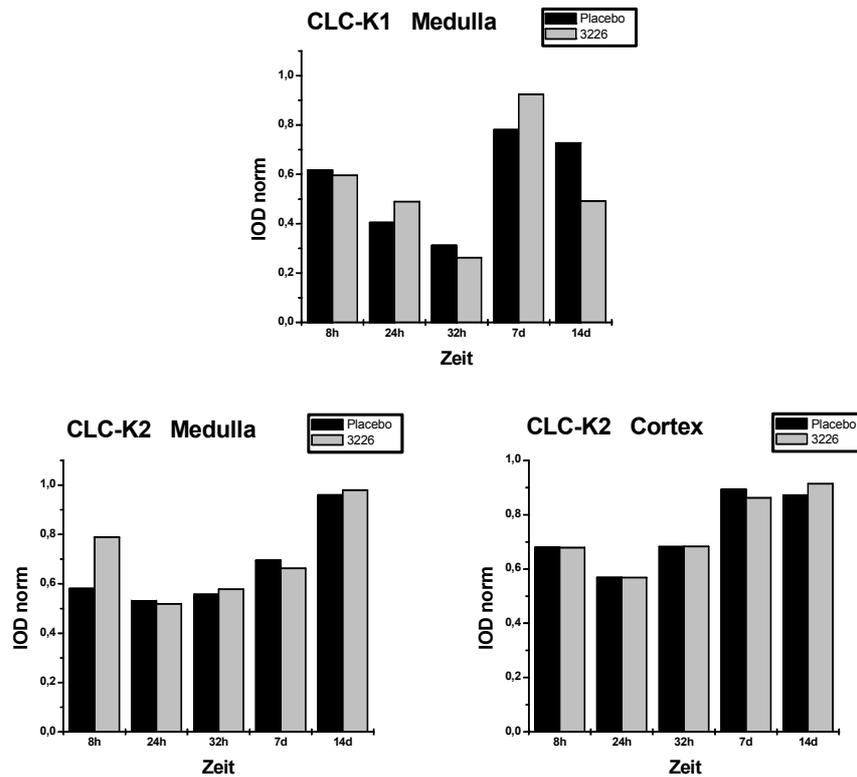


Abbildung 36: mRNA-Expressionswerte der RT-PCR-Analyse der Chloridkanäle CLC-K1 und CLC-K2, die mit gepoolter RNA aus Cortex und Medulla erstellt wurden. Die Messwerte sind auf die Kontrolltiere (n = 2) normiert (IOD norm, y-Achse) und gegen die Zeit aufgetragen (x-Achse). Die Werte der niereninsuffizienten Tiere sind für die mit Placebo behandelten Tiere (n = 3-4) mit schwarzen und die mit S3226 behandelten Tiere (n = 2-3) mit grauen Balken abgebildet.

## Ergebnisse

---

Die mRNA-Expressionswerte von **CLC-K2** in der Medulla waren bei den niereninsuffizienten Tieren innerhalb der ersten 7 Tage um 30-50% herabgesetzt. Auffällig war hier die mRNA-Expression nach 8 Stunden, da hier, wie bereits bei den Chloridkanälen CLC-3, CLC-5 und CLC-7 beobachtet, die Werte der mit S3226 behandelten Tiere weniger stark vermindert waren als die der mit Placebo behandelten Tiere. Nach 14 Tagen entsprachen die Werte wieder den Kontrollwerten. Verglichen mit der ersten Studie stimmten auch hier die Werte überein (siehe Tabelle 5).

Die mRNA-Expression von **CLC-K2** im Cortex sah folgendermaßen aus: Innerhalb der ersten 32 Stunden war bei den niereninsuffizienten Tieren eine Abnahme der mRNA-Expression um 30-40% zu beobachten. Anschließend erreichten die Werte nach 7 bzw. 14 Tagen wieder das Niveau der Kontrollwerte. Im Cortex war kein Unterschied zwischen den mit Placebo und den mit S3226 behandelten Tieren erkennbar. Die festgestellten Änderungen in der mRNA-Expression in den niereninsuffizienten Ratten entsprachen denen aus der ersten Studie (siehe Tabelle 4).

Insgesamt wurden keine deutlichen Unterschiede zwischen den mit S3226 und den mit Placebo behandelten Tieren festgestellt. Eine mögliche Beeinflussung der mRNA-Expression durch die Behandlung mit S3226 wurde allenfalls bei den Chloridkanälen CLC-3, CLC-5, CLC-7 und CLC-K2 nach 8 Stunden beobachtet (siehe Abbildung 34 und Abbildung 36). Die Expressionswerte der mit S3226 behandelten Tiere waren hier offenbar erhöht im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Tieren. Deshalb wurden Northern Blot- und RT-PCR-Analysen mit RNA von einzelnen Tieren zur Verifizierung dieser Ergebnisse wiederholt. In Abbildung 37 sind die Resultate anhand repräsentativer Northern Blots und RT-PCR-Analysen dargestellt.

Das Signal war in den Northern Blots bei den mit Placebo behandelten Tieren extrem schwach im Vergleich zu den mit S3226 behandelten oder scheinoperierten Tieren. Die Auswertung der Signale ergab jedoch zum Teil sehr starke Schwankungen bei den Werten der Einzeltiere, die mit S3226 behandelt worden waren (zum Beispiel bei CLC-5 und CLC-7, siehe Abbildung 37B und C). Auch bei der RT-PCR-Analyse waren Unterschiede in der Signalintensität zu beobachten (siehe Abbildung 37D). Hier war ein intensiveres Signal bei den mit S3226 behandelten im Vergleich zu den mit Placebo behandelten und den scheinoperierten Tieren zu erkennen. Die Schwankungen der Signale waren hier weniger stark ausgeprägt.

## Ergebnisse

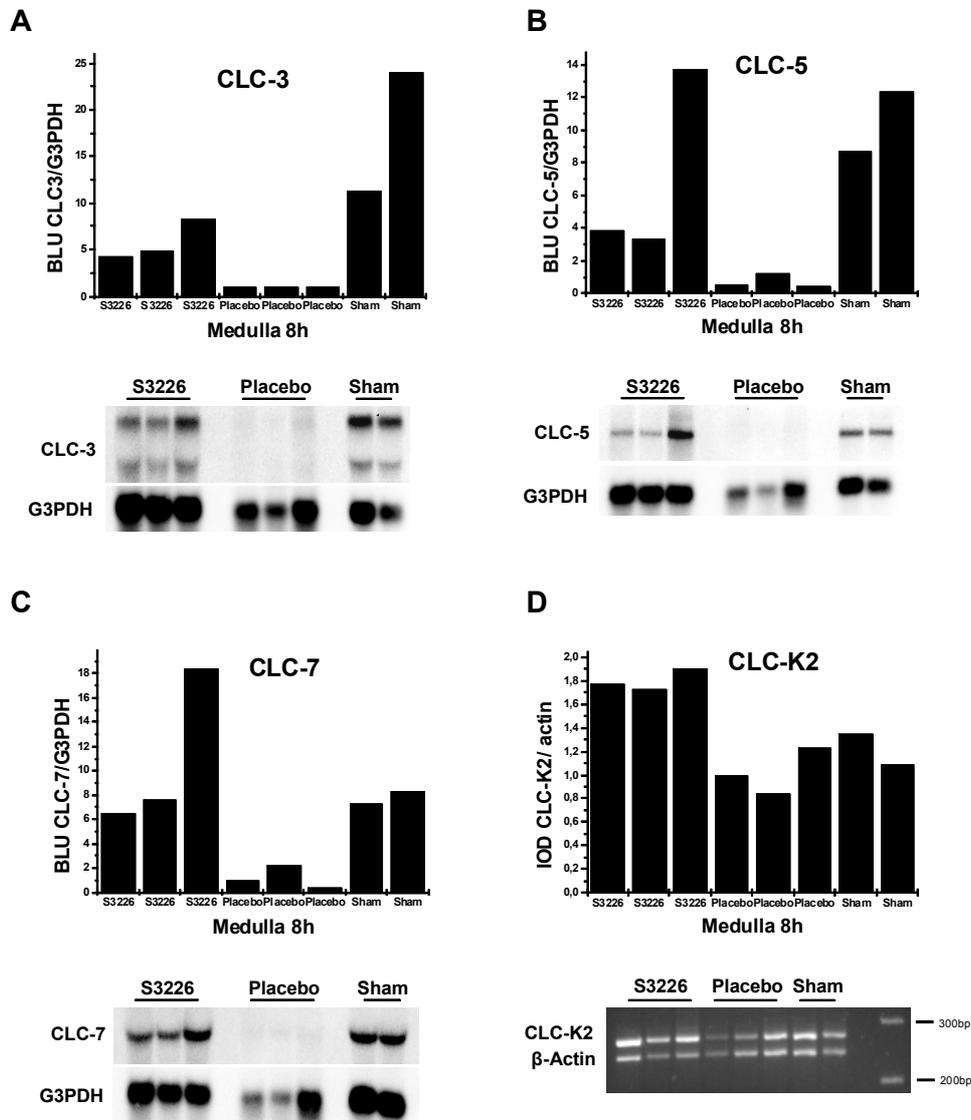


Abbildung 37: Repräsentative Northern Blots für **A** CLC-3, **B** CLC-5 und **C** CLC-7 und den Standard G3PDH, und **D** eine repräsentative RT-PCR-Analyse für CLC-K2. Untersucht wurde die RNA von einzelnen Tieren aus der Medulla von niereninsuffizienten Tieren, 8 Stunden nach der Operation. Die niereninsuffizienten Tiere waren mit Placebo (n = 3) oder S3226 (n = 3) behandelt worden, und als Kontrolltiere dienten scheinoperierte Ratten (Sham; n = 2).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse für die Einzeltiere ist in Abbildung 38 dargestellt. Bei der Interpretation dieser Analyse muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Anzahl der Tiere relativ gering war.

## Ergebnisse

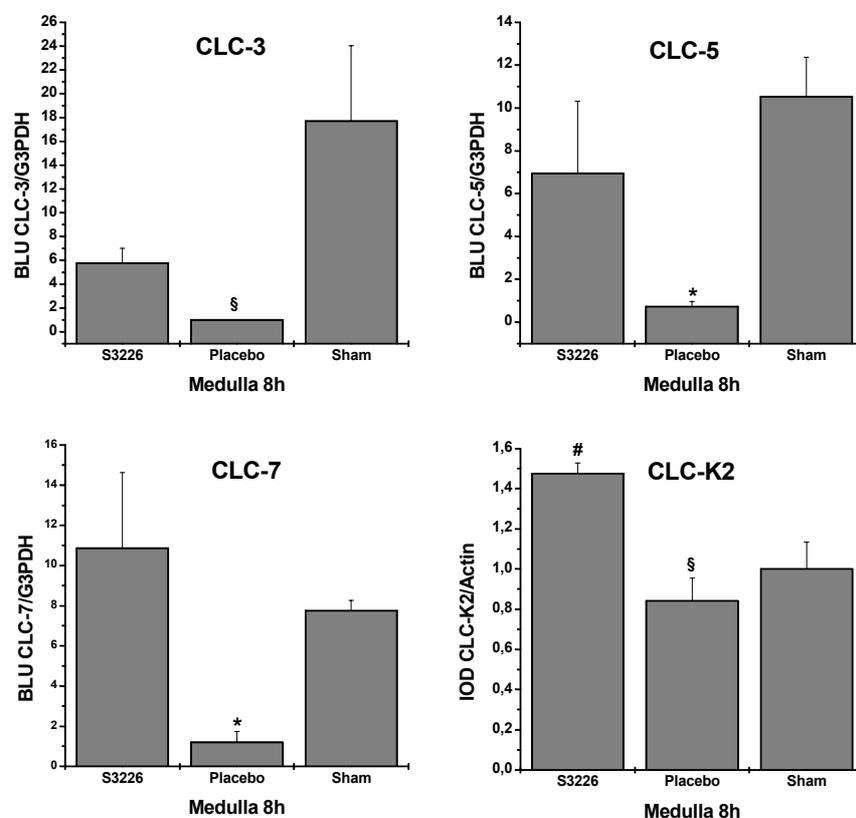


Abbildung 38: mRNA-Expressionswerte der CLC-Chloridkanäle CLC-3, CLC-5, CLC-7 und CLC-K2. Sie wurden mit Hilfe von Northern Blot- oder RT-PCR-Analysen mit der RNA aus der Medulla von Einzeltieren, 8 Stunden nach der Operation, generiert. Die niereninsuffizienten Tiere waren mit Placebo (n = 3) oder S3226 (n = 3) behandelt worden; als Kontrolltiere dienten scheinoperierte Ratten (Sham, n = 2). Eine Signifikanz der mit Placebo behandelten Tiere im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren ist durch \*, eine Signifikanz der mit Placebo im Vergleich zu den mit S3226 behandelten Tieren durch § und eine Signifikanz der mit S3226 behandelten Tiere im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren durch # gekennzeichnet.

Es zeigte sich bei **CLC-3** ein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression der mit S3226 im Vergleich zu den mit Placebo behandelten niereninsuffizienten Tieren. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression der mit S3226 und mit Placebo behandelten Tiere im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren festgestellt werden. Ursache hierfür war wahrscheinlich die große Schwankung in der mRNA-Expression der scheinoperierten Tiere und die geringe Zahl der untersuchten Tiere (n = 2).

Für die Chloridkanäle **CLC-5** und **CLC-7** wurde kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression der mit S3226 im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Tieren

## Ergebnisse

---

beobachtet. Die Ursache hierfür könnte u.a. die bereits erwähnte große interindividuelle Schwankung der mit S3226 behandelten Tiere gewesen sein. Zwischen den mit Placebo behandelten und den scheinoperierten Tieren gab es einen signifikanten Unterschied.

Für den Chloridkanal **CLC-K2** ergab sich wie bei CLC-3 ein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression der mit S3226 im Vergleich zu den mit Placebo behandelten niereninsuffizienten Tieren. Außerdem war der Unterschied in der mRNA-Expression der mit S3226 behandelten Tiere im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren signifikant, das heißt die mRNA-Expression von CLC-K2 wurde durch S3226 sogar gesteigert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in der zweiten Studie des Niereninsuffizienz-Modells 41 Tiere operiert und die niereninsuffizienten Tiere entweder mit S3226, einem NHE-3-Inhibitor, oder mit Placebo behandelt wurden. Die mRNA-Expressionsanalyse ergab für alle untersuchten CLC-Chloridkanäle, CLC-2 bis CLC-7 sowie CLC-K1 und CLC-K2, sowohl im Cortex als auch in der Medulla eine Abnahme der mRNA-Expression. Damit wurden die Ergebnisse aus der ersten Studie bestätigt. Der Verlauf der Abnahme stimmte ebenfalls tendenziell mit den Werten aus der ersten Studie überein, das heißt, innerhalb der ersten 32 Stunden nach der Operation war die Reduktion der mRNA-Expressionswerte am stärksten und nach 7 bzw. 14 Tagen wurde wieder ein Anstieg in Richtung der Kontrollwerte beobachtet.

Zwischen den Expressionsdaten der Tiere, die mit S3226 oder Placebo behandelt wurden, zeigte sich im Cortex kein Unterschied. In der Medulla war insgesamt kaum eine Veränderung in der mRNA-Expression zu erkennen; es fiel jedoch ein Zeitpunkt ins Auge: 8 Stunden nach der Operation zeigte sich für CLC-3, CLC-5, CLC-7 und CLC-K2 eine erhöhte mRNA-Expression der mit S3226 im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Tiere. Weitere Analysen mit Einzeltieren erhärteten den Hinweis darauf, dass die Gabe von S3226 einen Einfluss auf die mRNA-Expression einiger CLC-Chloridkanäle 8 Stunden nach akutem Nierenversagen hat. Am deutlichsten war dieser Effekt auf die mRNA-Expression von CLC-3 und CLC-K2.

### **3.4 Atriale Fibrillation und die Genexpression von Kalium- und Kalziumkanal-Untereinheiten**

Neben Bluthochdruck, Hypertrophie und Herzinsuffizienz wurde als weitere pathophysiologische Veränderung Vorhofflimmern untersucht. Die atriale Fibrillation ist die am häufigsten vorkommende Arrhythmieform beim Menschen und wird charakterisiert durch Veränderungen der elektrophysiologischen und strukturellen Eigenschaften des Vorhofes, wodurch das Auftreten und der Erhalt der Arrhythmie begünstigt werden. Dieser Prozess wird als „Remodeling“ bezeichnet (Wijffels *et al.*, 1995). Aufgrund des Vorhofflimmerns kommt es durch eine Abnahme der Expression der zugrunde liegenden Ionenkanalgene zu einer Verringerung der L-Typ-Kalziumströme ( $I_{Ca,L}$ ) und der  $I_{to}$ -Kaliumströme. Dies wurde bisher beim Menschen und an einigen Tierspezies gezeigt (Bosch *et al.*, 2000). Diese Veränderungen beginnen sehr rasch nach Einsetzen des Vorhofflimmerns. Der Zeitverlauf der transkriptionellen Veränderungen in dieser frühen Phase sollte in diesem Teil der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden. Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen ein neues Tiermodell für das Vorhofflimmern, das so genannte Rapid-Pacing-Modell im Kaninchen (siehe Abschnitt 2.3.6), etabliert und dieses sowohl elektrophysiologisch als auch molekularbiologisch charakterisiert. Die elektrophysiologischen Untersuchungen des L-Typ-Kalziumstromes  $I_{Ca,L}$  und des Kaliumstromes  $I_{to}$  wurden in Tübingen und die entsprechenden mRNA-Expressionsanalysen der für diese Ströme verantwortlichen Kalzium- und Kaliumkanal-Untereinheiten bei Aventis durchgeführt.

In dieser Tierstudie wurden für das Rapid-Pacing-Modell 24 Kaninchen operiert und unterschiedlich lange mit Hilfe einer Schrittmacherelektrode im Vorhof stimuliert. Deshalb erfolgte eine Aufteilung in fünf Gruppen ( $n = 4-6$ ): Kaninchen mit einer Vorhofstimulationsdauer von 6, 12 oder 24 Stunden sowie 4 Tagen und scheinoperierte Kaninchen ohne Stimulation. Nach Beendigung des Versuches wurden den Tieren die Vorhöfe der Herzen entnommen, und anschließend wurde die daraus isolierte RNA mittels der Ein-Schritt-RT-PCR-Analyse untersucht.

#### **3.4.1 Optimierung der RT-PCR-Bedingungen**

Die mRNA-Expressionsstudien der ausgewählten Kalium- und Kalziumkanal-Untereinheiten erfolgten mit Hilfe der semiquantitativen Ein-Schritt-RT-PCR-Analyse. Da dies für die im Kaninchen exprimierten Kanal-Untereinheiten bisher nicht beschrieben wurde, erfolgte zuerst eine Datenbanksuche nach der DNA-Sequenz der im Kaninchen vorkommenden Kalium- und Kalziumkanal-Untereinheiten, um Oligonukleotidprimer für die geplante RT-PCR-Analyse abzuleiten.

## Ergebnisse

Dabei wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Datenbankeinträge, die jedoch nicht alle eine vollständige Sequenz lieferten, gefunden und für die Generierung der Primer verwendet. Für die Kaliumkanal-Untereinheiten Kv1.4, Kv1.5, Kv4.2 und Kv4.3 wurden Homologe im Kaninchen entdeckt. Außerdem fanden sich für den L-Typ-Kalziumkanal die homologen  $\alpha$ -Untereinheiten alpha1 und alpha2 und die homologen  $\beta$ -Untereinheiten CaB2 sowie CaB3. Die  $\beta$ -Untereinheit CaB2 kommt in zwei Spleißvarianten CaB2a und CaB2b vor.

Tabelle 6: In der öffentlichen Datenbank GenBank gefundene Einträge zu den untersuchten Kanal-Untereinheiten im Kaninchen.

Kanal-Untereinheit im Kaninchen	Referenznummer in der Datenbank
Kv1.4	AJ291314
Kv1.5	AF149787
Kv4.2	AJ291315
Kv4.3	AF198445
alpha1	X15539
alpha2	M21948
CaB2a	X64297
CaB2b	X64298
CaB3	X64300
G3PDH	L23961

Aus den gefundenen Sequenzen wurden mehrere Primer abgeleitet und getestet. Die in Tabelle 7 aufgelisteten Primer wurden für die RT-PCR-Analysen verwendet.

Tabelle 7: Für die Ein-Schritt-RT-PCR-Analyse verwendete Oligonukleotidprimer.

Kanal-Untereinheit	Bezeichnung des Oligonukleotids	DNA-Sequenz
<b>Kv1.4</b>	Kv1.4 f1	5' TTA TGG TTA TGC AGC CCA G 3'
	Kv1.4 rev1	5' TCC TCC TCG TCT TCC TCT TC 3'
<b>Kv1.5</b>	Kv1.5 f1	5' CCT CAT CTC CAT CAT CAC 3'
	Kv1.5 rev2	5' TGA AGA TGC GGA ACA CAC 3'
<b>Kv4.2</b>	Kv4.2 f	5' CAA GGC AGG AGA GAA AAA G 3'
	Kv4.2 rev1	5' ATT CAG GAT GTG ACG GAA G 3'
<b>Kv4.3</b>	Kv4.3 f	5' TTC CTC CTC TTC TCC CTC AC 3'
	Kv4.3 rev	5' GCT TTC TTT TGT GCC CTG 3'
<b>alpha1</b>	alpha1 rabbit s3	5' GAC TCC ACT TTC ACC CCC 3'
	alpha1 rabbit as3	5' TCT CCC CCT TGA TTC TTC TGC C 3'
<b>alpha2</b>	alpha2 rabbit s	5' GCC TCC ATG TCA AAG CAG AGC 3'
	alpha2 rabbit as	5' ACA TTG TTG TCA AAG CAG ACA TC 3'
<b>CaB2a</b> <b>CaB2b</b>	CaB2a f	5' AGC TTG CGC TGA GTT CTT GC 3'
	CaB2b f2	5' GCT TCC ATT TTT CTC TGC TTC C 3'
	CaB2 rev	5' TCC CTT GCT TTG CTC TCT G 3'
<b>CaB3</b>	CaB3 s	5' TGG CAA GAG GAC CAT CAT TGA G 3'
	CaB3 as	5' CGT CCG CAT AGT CTT CCT C 3'
<b>G3PDH</b>	G3PDH rabbit f	5' GCT TTT AAC TCT GGC AAA GTG 3'
	G3PDH rabbit rev	5' GAT GAT GAC CCT TTT GGC TC 3'

## Ergebnisse

Für die Amplifikation der Kalziumkanal-Untereinheiten CaB2a und CaB2b wurden aufgrund ihrer hohen Sequenzidentität unterschiedliche Hinprimer (der Primer CaB2a f für CaB2a und der Primer CaB2b f2 für CaB2b), jedoch derselbe Rückprimer (CaB2 rev) eingesetzt. Anschließend erfolgte die Optimierung der Reaktionsbedingungen für die nachfolgende RT-PCR-Analyse, um die optimale Annealing-Temperatur und Zyklenzahl sowie den Effekt der Q-Solution (Zusammensetzung nicht bekannt, Qiagen) zu ermitteln.

Zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur der Primer wurden für jede Untereinheit RT-PCR-Analysen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Nachdem eine deutliche Bande mit ausreichender Signalintensität erreicht wurde, erfolgten alle weiteren Versuche bei dieser Temperatur. Außerdem wurden RT-PCR-Analysen mit und ohne Q-Solution aus dem OneStep-RT-PCR-Kit durchgeführt. Meistens war es möglich, durch den Einsatz der Q-Solution die Spezifität der Reaktion zu erhöhen und die Amplifizierung unspezifischer Banden zu verhindern, wie am Beispiel der alpha1-Untereinheit in Abbildung 39 ersichtlich wird.

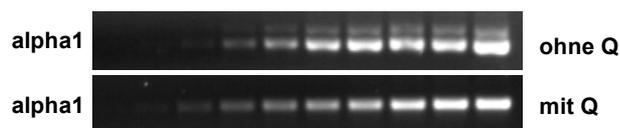


Abbildung 39: Produkte aus zwei RT-PCR-Analysen mit zunehmender Zyklenzahl für die Kalziumkanal-Untereinheit alpha1, mit und ohne Q-Solution, in einem Ethidiumbromid-enthaltenden Agarosegel.

Für die Optimierung der Zyklenzahl wurden zunächst RT-PCR-Analysen mit hoher Zyklenzahl angefertigt und Proben zu unterschiedlichen Zeiten aus dem Reaktionsansatz entnommen. Die daraus gewonnenen Produkte wurden auf einem Agarosegel analysiert (siehe Abbildung 40). Für jede Kanal-Untereinheit wurde die Zyklenzahl ausgesucht, bei der noch keine Sättigung der Signalintensität erreicht war. So ließ sich zum Beispiel für die Kalziumkanal-Untereinheit alpha1 eine optimale Zyklenzahl von  $n = 34$  definieren.

## Ergebnisse

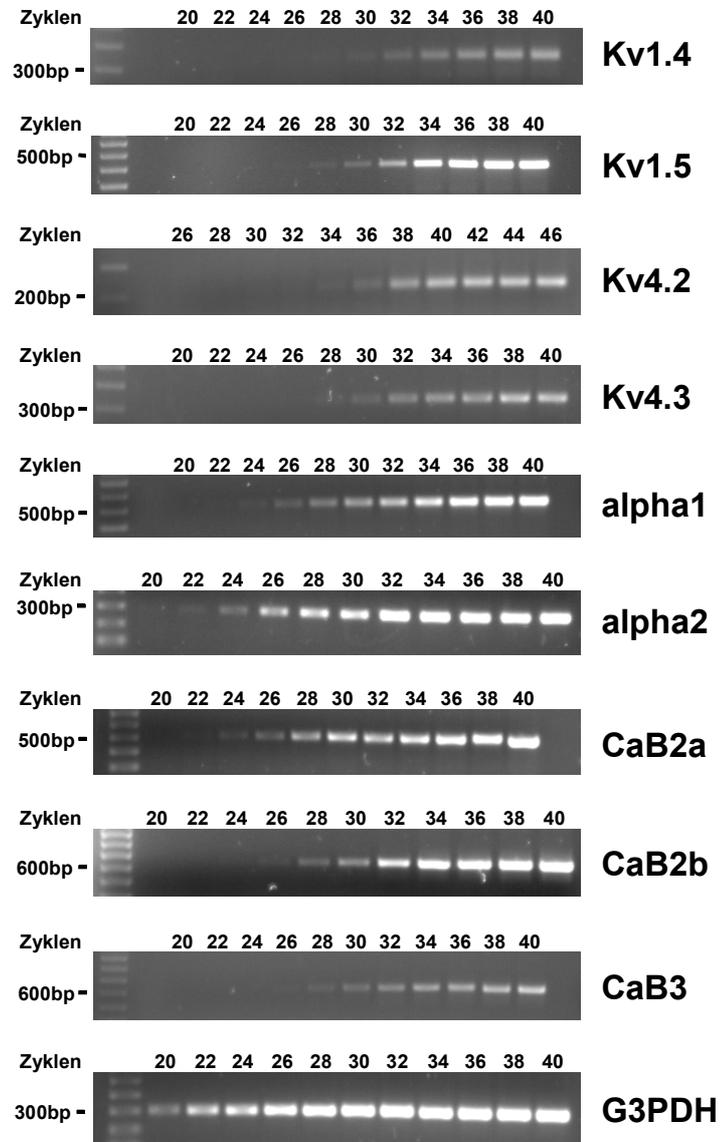


Abbildung 40: Optimierung der Zyklusanzahl für die Ein-Schritt-RT-PCR-Analyse für die verschiedenen Kanal-Untereinheiten sowie für G3PDH. Die RT-PCR-Produkte wurden auf ein Ethidiumbromid-enthaltendes Agarosegel aufgetragen. Die richtige Bandengröße (links neben den Abbildungen) wurde mit Hilfe eines Größenstandards überprüft. Die optimale Zyklusanzahl war erreicht, wenn noch keine Sättigung in der Signalintensität aufgetreten war.

In Tabelle 8 sind die für die nachfolgenden Versuche verwendeten Parameter zusammengefasst. Die zu erwartenden Größen der RT-PCR-Amplifikationsprodukte sind ebenfalls aufgeführt.

## Ergebnisse

Tabelle 8: Für die RT-PCR-Analyse verwendete Reaktionsbedingungen.

Kanal-Untereinheit	Annealing-Temperatur	Zyklusanzahl	Größe des PCR-Produktes	Q-Solution
Kv1.4	58°C	34	336 bp	Q
Kv1.5	57°C	34	460 bp	Q
Kv4.2	51°C	38	200 bp	Q
Kv4.3	57°C	34	308 bp	Q
alpha1	65°C	34	490 bp	Q
alpha2	54°C	30	290 bp	-
CaB2a	52°C	34	500 bp	Q
CaB2b	60°C	34	620 bp	Q
CaB3	64°C	36	580 bp	Q
G3PDH	50°C	28	300 bp	-

### 3.4.2 Die Genexpression der für den $I_{to}$ Kaliumstrom verantwortlichen Kaliumkanal-Untereinheiten: Kv4.3, Kv4.2 und Kv1.4

Elektrophysiologische Messungen, die von Norman Rüb an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in einzelnen Myozyten aus dem Vorhof des Kaninchens (siehe Abbildung 41) durchgeführt wurden, zeigten, dass die Stromdichten von  $I_{to}$  nach einer Schrittmacher-Stimulationsdauer von 24 Stunden um ungefähr 50% abnehmen.

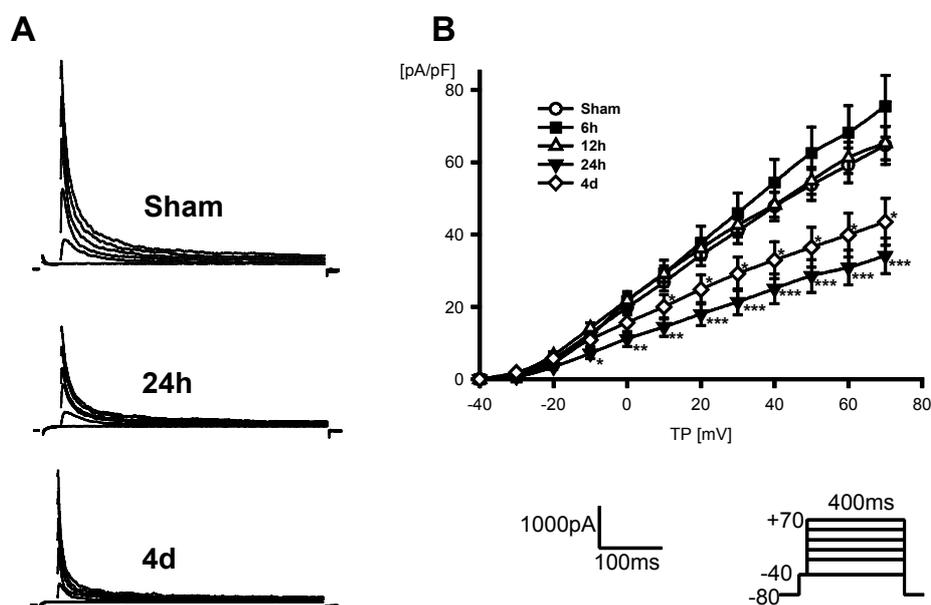


Abbildung 41: Transienter Auswärtskaliumstrom  $I_{to}$  beim stimulierten Vorhofflimmern im Kaninchen. Bei **A** sind repräsentative  $I_{to}$ -Stromkurven von einer Vorhofzelle zum Zeitpunkt 0 (scheinoperiertes Tier, Sham), nach 24 Stunden und 4 Tagen abgebildet. **B** zeigt die Strom-Spannungsbeziehung der  $I_{to}$ -Stromdichten. TP: Testpotential. Eine signifikante Änderung ist durch \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ) gekennzeichnet.

## Ergebnisse

---

Nach viertägiger Stimulationsdauer befanden sich die Stromdichten annähernd auf demselben Niveau. Da die Kaliumkanal-Untereinheiten Kv4.3, Kv4.2 und Kv1.4 die molekularen Kandidaten für den transienten Kaliumauswärtsstrom  $I_{to}$  im Kaninchen sind (siehe Abschnitt 1.1), wurde die mRNA-Expression dieser Kaliumkanal-Untereinheiten in den Vorhöfen der Herzen mit Hilfe der Ein-Schritt-RT-PCR-Analyse untersucht.

In Abbildung 42 sind repräsentative Agarosegele für die Kaliumkanal-Untereinheiten Kv4.3, Kv4.2, Kv1.4 und den Standard G3PDH sowie die densitometrische Auswertung der Signale dargestellt.

Die mRNA-Expression der Kaliumkanal-Untereinheit Kv4.3 war nach einer Stimulationsdauer von 12 Stunden signifikant gegenüber den Kontrolltieren vermindert. Dieser Effekt wurde nach einer 24-stündigen Stimulationsdauer noch deutlicher und war auch nach einer Stimulationsdauer von 4 Tagen noch vorhanden. Die maximale Abnahme der mRNA-Expression betrug ca. 20% im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren. Die mRNA-Expression der verwandten Isoform Kv4.2 blieb hingegen weitgehend unverändert und war sogar nach einer Stimulationsdauer von 4 Tagen im Vergleich zum Kontrollwert leicht erhöht.

Für die Kaliumkanal-Untereinheit Kv1.4 wurde ebenso wie für Kv4.3 eine Abnahme der mRNA-Expression beobachtet. Bereits nach 6, wie auch nach 12 Stunden, war die mRNA-Expression signifikant um ca. 40% im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren herabgesetzt. Diese Reduktion war auch nach 24 Stunden und noch nach 4 Tagen erkennbar.

## Ergebnisse

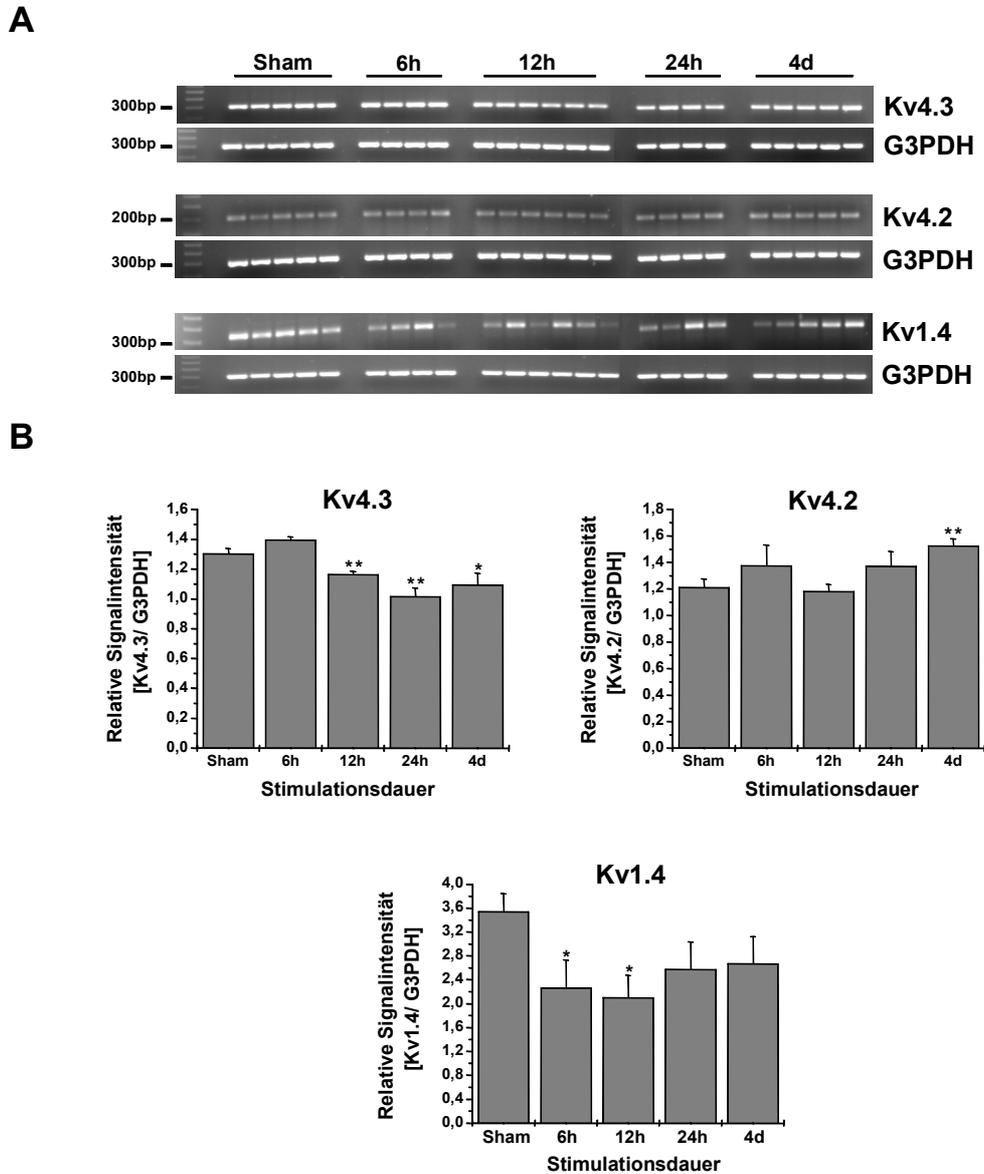


Abbildung 42: Effekte der Vorhoffrequenzstimulation im Kaninchen auf die mRNA-Expression der Kaliumkanal-Untereinheiten Kv4.3, Kv4.2 und Kv1.4 in den Vorhöfen des Herzens. Hier sind bei **A** repräsentative RT-PCR-Produkte für Kv4.3, Kv4.2 und Kv1.4 in einem Ethidiumbromid-enthaltenden Agarosegel abgebildet. **B** zeigt ein Balkendiagramm der densitometrischen Auswertung. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt. Eine signifikante Änderung der mRNA-Expression der stimulierten Kaninchen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren ist durch \* ( $p < 0,05$ ) oder \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

## Ergebnisse

In Abbildung 43 ist die Korrelation zwischen der Abnahme des transienten Auswärtsstromes  $I_{to}$  und der Genexpression der Kaliumkanal-Untereinheiten Kv4.3 und Kv1.4 dargestellt.

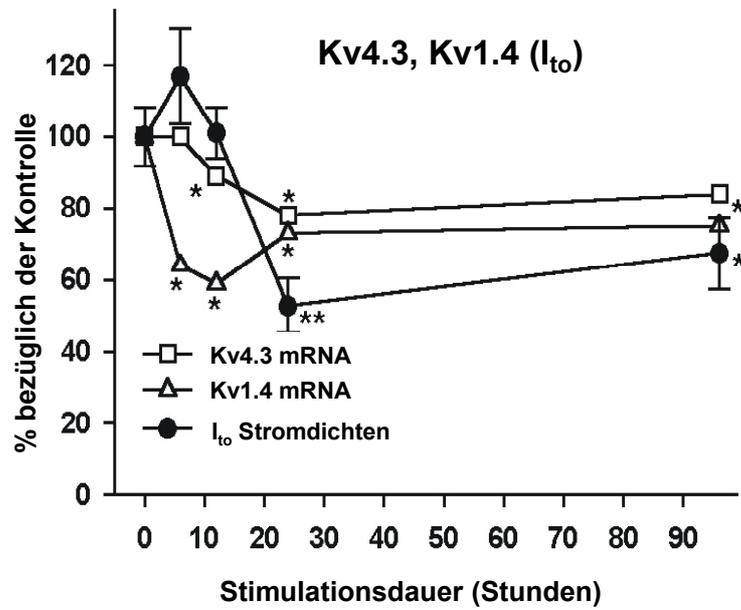


Abbildung 43: Zeitlicher Verlauf der Veränderungen des transienten Auswärtsstromes  $I_{to}$  und der mRNA-Expression der Kaliumkanal-Untereinheiten Kv4.3 und Kv1.4 Herzvorhof. Aufgetragen ist die prozentuale Abnahme der Werte der frequenzstimulierten Kaninchen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren gegen die unterschiedlich lange Stimulationsdauer des Vorhofes. Eine signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrolle ist durch \* ( $p < 0,05$ ) oder \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

Sowohl die Kaliumstromdichte als auch die Genexpression der zugrundeliegenden Kaliumkanal-Untereinheiten waren herabgesetzt und blieben mit zunehmender Dauer der Vorhofstimulation weiterhin erniedrigt. Die transkriptionelle Abnahme ging der Abnahme des Stromes voraus. So waren bereits nach 6-12 Stunden die Kaliumkanal-Untereinheiten Kv1.4 und Kv4.3 herunterreguliert, während die Abnahme der Stromdichte des  $I_{to}$  erst nach 24 Stunden erfolgte.

## Ergebnisse

Bei den Tieren mit atrialer Fibrillation war in den Vorhöfen des Herzens eine signifikante Verringerung der mRNA-Expression der Kaliumkanal-Untereinheiten Kv4.3 und Kv1.4 und eine unveränderte Genexpression von Kv4.2 im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren zu beobachten. Die Abnahme der mRNA-Expression war bei Kv1.4 stärker (ca. 40%) und trat schneller ein, nämlich bereits nach 6 Stunden. Die Abnahme der mRNA-Expression bei der Kaliumkanal-Untereinheit Kv4.3 trat hingegen erst später nach 12 Stunden ein und war um ca. 20% herabgesetzt.

Die Abnahme der Genexpression der Kaliumkanal-Untereinheiten Kv1.4 und Kv4.3 ging der Abnahme in der Stromdichte des Kaliumstromes  $I_{to}$  voraus. Das Ausmaß der Reduktion in der Stromdichte entsprach der summierten Reduktion der Genexpression beider Kaliumkanal-Untereinheiten.

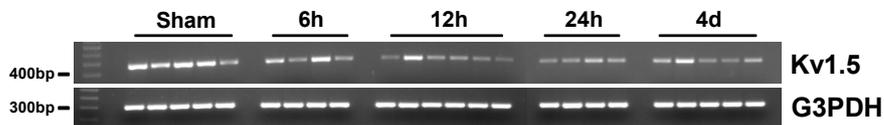
### 3.4.3 Die Genexpression der Kaliumkanal-Untereinheit Kv1.5

Die Kaliumkanal-Untereinheit Kv1.5 ist für die Hauptkomponente des repolarisierenden Kaliumstromes  $I_{Kur}$  im Vorhof des menschlichen Herzens verantwortlich (siehe Abschnitt 1.1). Der  $I_{Kur}$  konnte jedoch im Kaninchen bisher noch nicht gemessen werden. Die Untereinheit Kv1.5 ist aber auch im Kaninchen auf mRNA-Ebene nachweisbar. Über die Regulation der Kv1-5-Genexpression bei atrialer Fibrillation im Mensch und in Tiermodellen gibt es widersprüchliche Resultate (Van Wagoner *et al.*, 1997; Yue *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 1999a; Grammer *et al.*, 2000a; Van der Velden *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2000; Brundel *et al.*, 2001b). Deshalb wurde diese Kaliumkanal-Untereinheit in die Untersuchungen miteinbezogen.

Die Abbildung 44 zeigt ein repräsentatives Ergebnis der RT-PCR-Analyse für die Kaliumkanal-Untereinheit Kv1.5 und G3PDH sowie die densitometrische Auswertung der Signale in Form eines Balkendiagramms.

## Ergebnisse

**A**



**B**

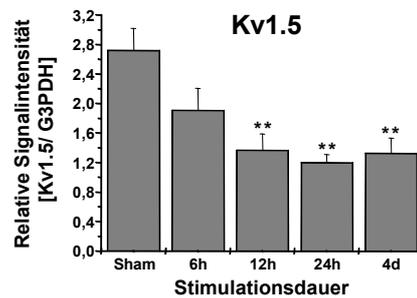


Abbildung 44: Verlauf der mRNA-Expression der Kaliumkanal-Untereinheit Kv1.5 in den Vorhöfen des Herzens nach Vorhofstimulation. Bei **A** sind repräsentative RT-PCR-Produkte für Kv1.5 in einem Ethidiumbromid-enthaltenden Agarosegel abgebildet. **B** zeigt ein Balkendiagramm der densitometrischen Analyse. Die ermittelten Expressionswerte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt. Eine signifikante Änderung der mRNA-Expression der stimulierten Kaninchen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren ist durch \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

Im Verlauf der atrialen Stimulation war eine signifikante Abnahme der mRNA-Expressionswerte von Kv1.5 in den Vorhöfen des Herzens nach einer Stimulationsdauer des Vorhofes von 12 Stunden um ca. 50% zu beobachten. Auch nach 24-stündiger sowie nach 4-tägiger Stimulationsdauer blieben die Werte signifikant um denselben Prozentsatz herabgesetzt.

### 3.4.4 Die Genexpression der für den $I_{Ca,L}$ Kalziumstrom verantwortlichen Kalziumkanal-Untereinheiten: alpha1, alpha2, CaB2a, CaB2b und CaB3

Messungen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik in einzelnen isolierten Vorhofmyozyten des Kaninchens (siehe Abbildung 45) zeigten, dass es bereits nach einer Vorhofstimulationsdauer von 6 Stunden zu einer Abnahme des Kalziumstromes  $I_{Ca,L}$  kommt. Nach einer Stimulationsdauer von 12 Stunden war der L-Typ-Kalziumstrom auf ungefähr 50% seines ursprünglichen Wertes reduziert, und nach einer Stimulationsdauer von 4 Tagen war der Kalziumstrom fast nicht mehr zu beobachten.

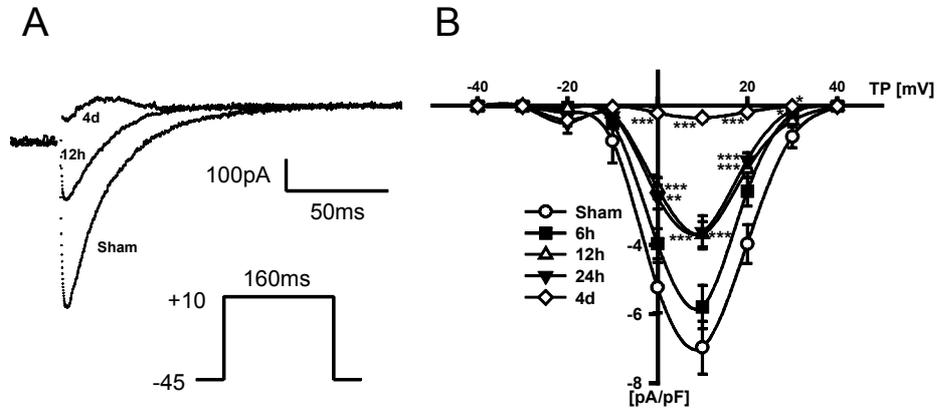


Abbildung 45: **A** zeigt Originalaufnahmen von Stromkurven des  $I_{Ca,L}$  in Vorhofzellen der scheinoperierten Kontrollgruppe (Sham) und nach 12 Stunden und 4 Tagen atrialer Stimulation. Alle drei Zellen hatten eine vergleichbare Kapazität. Bei **B** ist die Strom-Spannungsbeziehung der Kalzium-Stromdichten für die verschiedenen Gruppen dargestellt. TP: Testpotential. Eine signifikante Änderung ist durch \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ) gekennzeichnet.

Die Kalziumkanal-Untereinheit alpha1 ist die wichtigste Untereinheit im Komplex des L-Typ-Kalziumkanals, da sie die Pore des Kanals bildet (siehe Abschnitt 1.1.). Eine Verringerung der mRNA-Expression der alpha1-Untereinheit wurde bereits im Menschen mit chronischem Vorhofflimmern und im Hunde-Modell für die atriale Fibrillation mehrfach beschrieben (Grammer *et al.*, 2000b; Lai *et al.*, 1999b; Van Gelder *et al.*, 1999; Yue *et al.*, 1999).

Wie in Abbildung 46 zu erkennen ist, konnte auch im Kaninchenmodell eine Abnahme der mRNA-Expression der alpha1-Untereinheit nachgewiesen werden. Nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden war die mRNA-Expression im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren signifikant um ca. 40% vermindert. Nach 4 Tagen lag immer noch eine signifikante Verringerung der mRNA-Expression von alpha1 um ca. 50% vor. Im Gegensatz dazu wurde bei der alpha2-Untereinheit keine Veränderung in der mRNA-Expression nach Vorhofstimulation festgestellt (siehe Abbildung 46).

## Ergebnisse

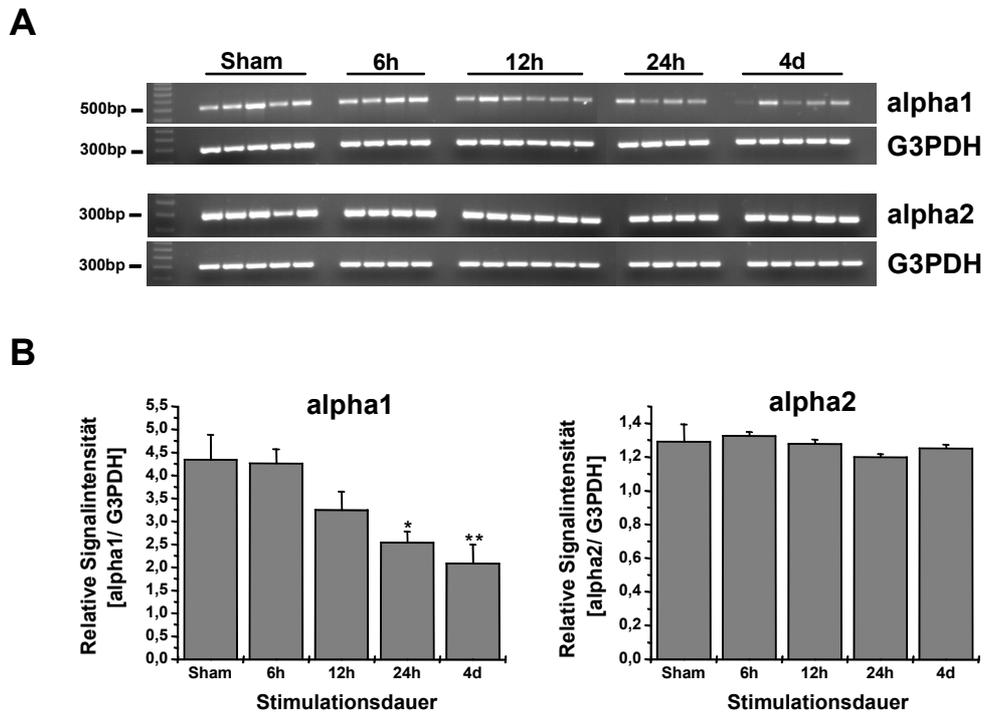


Abbildung 46: Verlauf der mRNA-Expression der Kalziumkanal-Untereinheiten alpha1 und alpha2 in den Vorhöfen des Herzens nach Vorhofstimulation. Bei **A** sind repräsentative RT-PCR-Produkte für alpha1 und alpha2 in einem Ethidiumbromid-enthaltenden Agarosegel abgebildet. **B** zeigt ein Balkendiagramm der densitometrischen Analyse. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt. Eine signifikante Änderung der mRNA-Expression der stimulierten Kaninchen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren ist durch \* ( $p < 0,05$ ) oder \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

Neben den  $\alpha$ -Untereinheiten wurden auch die Kalziumkanal- $\beta$ -Untereinheiten CaB2a, CaB2b und CaB3 untersucht (siehe Abbildung 47). Bei allen drei Untereinheiten war eine Verringerung der mRNA-Expression in den Vorhöfen des Herzens zu erkennen. Die Genexpression von CaB2a wurde bei einer Stimulationsdauer von 12, 24 Stunden und 4 Tagen signifikant um ca. 45-55% im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren herabgesetzt. Bei der Spleißvariante CaB2b war nach einer 6-, 12-, und 24-stündigen, sowie nach einer 4-tägigen Stimulationsdauer eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression um ca. 30% zu beobachten. Die mRNA-Expressionswerte der dritten Isoform CaB3 waren wie die Untereinheit CaB2b bei jeder analysierten Stimulationsdauer signifikant um ca. 20% vermindert.

## Ergebnisse

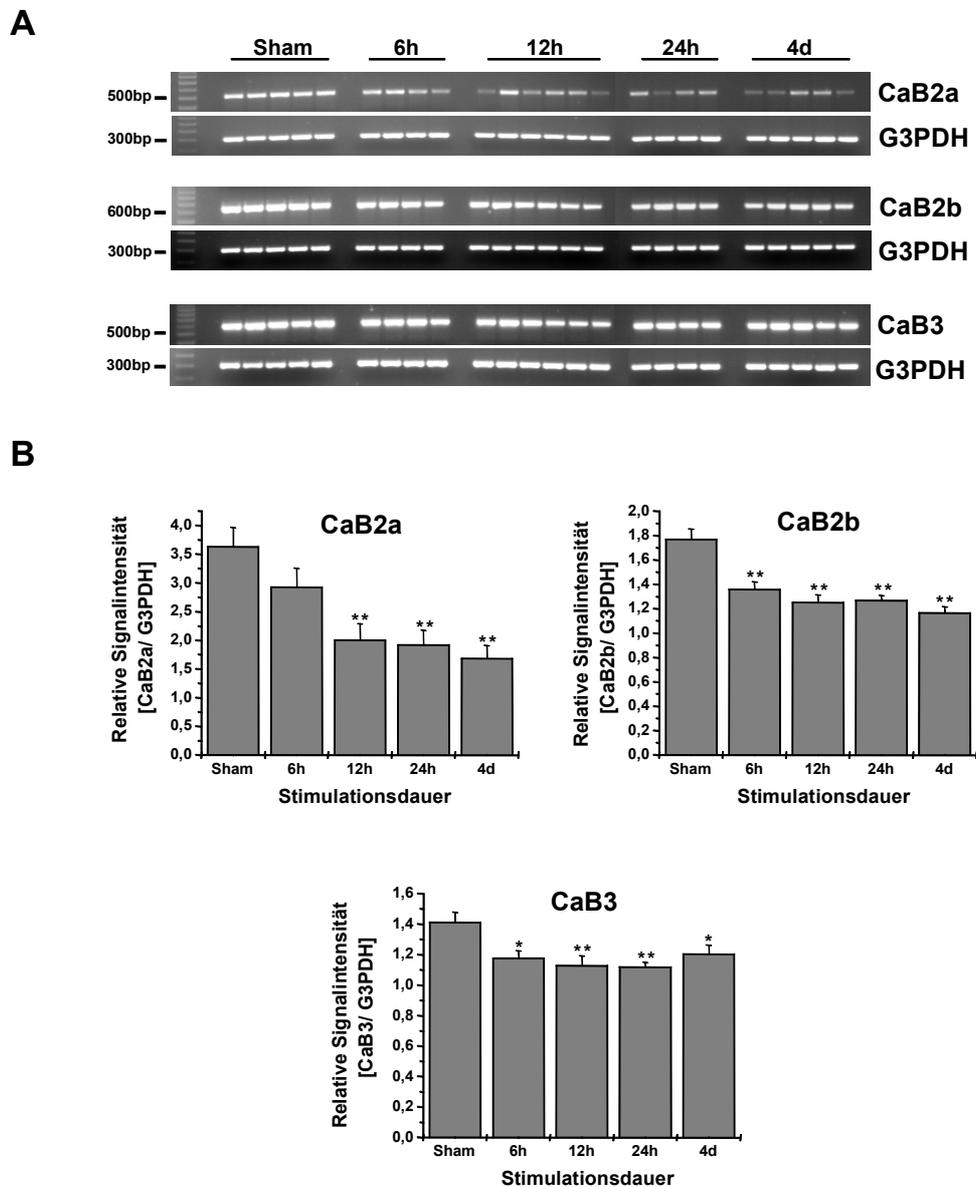


Abbildung 47: Verlauf der mRNA-Expression der Kalziumkanal-Untereinheiten CaB2a, CaB2b und CaB3 in den Vorhöfen des Herzens nach Vorhofstimulation. Bei **A** sind repräsentative RT-PCR-Produkte für CaB2a, CaB2b und CaB3 in einem Ethidiumbromid-enthaltenden Agarosegel abgebildet. **B** zeigt ein Balkendiagramm der densitometrischen Analyse. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. dargestellt. Eine signifikante Änderung der mRNA-Expression der stimulierten Kaninchen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren ist durch \* ( $p < 0,05$ ) oder \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

In Abbildung 48 sind die Stromdichten des  $I_{Ca,L}$  und die mRNA-Expressionswerte der Kalziumkanal-Untereinheiten  $\alpha_1$ , CaB2a, CaB2b und CaB3 zusammengefasst. Ein

## Ergebnisse

Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Stromdichten des  $I_{Ca,L}$  und der Genexpression der Untereinheiten des L-Typ-Kalziumkanals ist deutlich erkennbar. Die Abnahme des  $I_{Ca,L}$ -Stromes und die Abnahme der Expression der Kalziumkanal-Untereinheiten verläuft parallel.

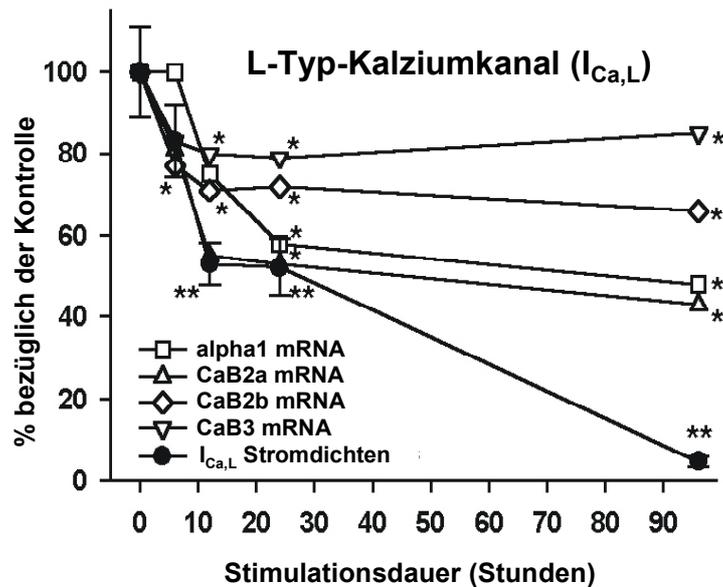


Abbildung 48: Zeitlicher Verlauf der Veränderungen des L-Typ-Kalziumstromes  $I_{Ca,L}$  in den Vorhofmyozyten und Verlauf der mRNA-Expression der Kalziumkanal-Untereinheiten alpha1, CaB2a, CaB2b und CaB3 in den Vorhöfen des Herzens. Aufgetragen ist die prozentuale Abnahme der Werte der stimulierten Kaninchen im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren gegen die unterschiedlich lange Stimulationsdauer des Vorhofes. Eine signifikante Änderung ist durch \* ( $p < 0,05$ ) oder \*\* ( $p < 0,01$ ) gekennzeichnet.

Das bedeutet zusammengefasst für die Kalziumkanal-Untereinheiten, dass im Kaninchenmodell für das Vorhofflimmern die mRNA-Expression der wichtigen porenbildenden alpha1-Untereinheit und der akzessorischen Untereinheiten CaB2a, CaB2b und CaB3 in den Vorhöfen des Herzens signifikant verringert wurde. Die Genexpression der Untereinheit alpha2 blieb hingegen unverändert. Parallel dazu ließ sich eine drastische Reduktion der Stromdichte des Kalziumstromes  $I_{Ca,L}$  in den Vorhofmyozyten beobachten.

## 4 Diskussion

In diesem Kapitel wird zuerst die mögliche Bedeutung der CLC-Chloridkanäle in unterschiedlichen Tiermodellen, die für die Indikation Herz-Kreislauf relevant sind, diskutiert. Dann wird erörtert, wie die veränderte Genexpression der CLC-Chloridkanäle im Niereninsuffizienz-Modell im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild stehen könnte. Welche Rolle die veränderte Genexpression einiger Kalium- und Kalziumkanal-Untereinheiten im Tiermodell für die atriale Fibrillation bei den beobachteten pathophysiologischen und elektrophysiologischen Veränderungen im Herzen spielt, ist Gegenstand der weiteren Betrachtungen. Schließlich wird in einem Ausblick die Relevanz der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse für zukünftige Forschungsprojekte erläutert.

### ***4.1 Die CLC-Chloridkanäle und ihre mögliche Bedeutung für die kardiovaskulären Erkrankungen Bluthochdruck, kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz***

Die in dieser Arbeit untersuchten Tiermodelle sind mehrfach beschrieben und umfassend charakterisiert worden. Die funktionellen und strukturellen Veränderungen im Herz-Kreislauf-System dieser Modelle besitzen große Ähnlichkeiten mit den Veränderungen, die bei Bluthochdruck, kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz des Menschen beobachtet werden.

#### **Genexpression der CLC-Chloridkanäle in SHR und SH-stroke-prone-Ratten**

Das Ziel der Genprofilierungsstudien in der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob die in Herz und Niere exprimierten CLC-Gene auf transkriptioneller Ebene unterschiedlich reguliert werden. Der Grund hierfür ist die Annahme, dass eine erhöhte oder eine verminderte Genexpression zu der Pathologie dieser Erkrankungen beitragen könnte. Es ist denkbar, dass die spezifisch in der Niere vorkommenden Kanäle CLC-5, CLC-K1 und CLC-K2 bei der Entstehung des Bluthochdruckes und der Nephropathie eine Rolle spielen.

Es konnten jedoch keine auffälligen Unterschiede in der mRNA-Expression der CLC-Gene in den Organen der hypertensiven Ratten im Vergleich zu den Organen der normotensiven Kontrolltiere nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13 und Abbildung 16, auf den Seiten 57 und 60). Damit konnte gezeigt werden, dass die Genexpression der CLC-Gene bei diesen Krankheitsbildern in den beiden Tiermodellen SHR und SHR-stroke-prone nicht verändert ist.

#### **Genexpression der CLC-Chloridkanäle in salz-sensitive Dahl-Ratten**

Die Chloridaufnahme in der Henleschen Schleife ist bei den salz-sensitiven Dahl-Ratten im Gegensatz zu den salz-resistenten Dahl-Ratten bereits vor Eintritt der Hypertonie erhöht

(Roman und Kaldunski, 1991; Kirchner, 1992). Diese gesteigerte Chloridresorption könnte die Prädisposition dieser Tiere, nach einer salzreichen Diät Bluthochdruck zu entwickeln, erklären. Übereinstimmend damit wurde ein leichter Anstieg der mRNA-Expression von CLC-K2 um den Faktor 1,7 in der inneren Medulla von salz-sensitiven Dahl-Ratten im Vergleich zu salz-resistenten Dahl-Ratten beschrieben (Castrop *et al.*, 2000). Außerdem verursachte die salzhaltige Diät eine Abnahme der mRNA-Expression von CLC-K2 in der Medulla der beiden Rattenstämme um 40-50%, wodurch die ursprüngliche Differenz in der CLC-K2-Expression jedoch mehr oder weniger unbeeinflusst blieb. In unseren Versuchen konnten wir den Unterschied in der CLC-K2-Expression zwischen den beiden Rattenstämmen jedoch nicht bestätigen. In unserer Studie wurde aber weder die mRNA-Expression zwischen den beiden Stämmen unter normaler Diät verglichen, noch wurde zwischen den verschiedenen Nierenabschnitten unterschieden. Stattdessen wurde die ganze Niere untersucht. Es ist möglich, dass dadurch geringfügige Änderungen in der Genexpression in einem bestimmten Tubulusabschnitt unbemerkt blieben. Ob die beschriebenen geringfügigen Unterschiede in der CLC-K2-Expression die Sensitivität der salz-sensitiven Dahl-Ratten gegenüber der Salzdiät erklären können, bleibt jedoch unklar. Auch für die anderen CLC-Chloridkanäle konnten keine auffälligen Unterschiede in ihrer mRNA-Expression zwischen den salz-sensitiven Dahl-Ratten und den salz-resistenten Dahl-Ratten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18, Seite 62).

### **Genexpression der CLC-Chloridkanäle im Aortic-Banding-Modell**

Nach dem Abklemmen der suprarenalen Aorta (Aortic-Banding) entwickeln die Ratten ebenfalls Bluthochdruck und kardiale Hypertrophie. Für die Hypertrophie charakteristische biologische Marker sind bereits sechs Wochen nach der Operation sichtbar.

Das Aortic-Banding in der Ratte induziert einen auswärtsrektifizierenden Chloridstrom in den hypertrophierten ventrikulären Myozyten (Bénitah *et al.*, 1997). Da es bei der Hypertrophie zu einer Zunahme des Zellvolumens kommt, handelt es sich bei diesem Chloridstrom sehr wahrscheinlich um schwellungs-sensitive Chloridkanäle, die ebenfalls auswärts-gleichrichtende Stromeigenschaften zeigen. In den hypertrophierten Herzzellen ist die Dauer des Aktionspotentials erhöht (Bénitah *et al.*, 1997). Die Aktivierung eines Chloridstromes würde aber eine schnellere Repolarisation der Zellmembran, und damit eine Verkürzung des Aktionspotentials bewirken. Man nimmt deshalb an, dass Chloridkanäle bei der kardialen Hypertrophie einer übermäßigen Verlängerung der Aktionspotentialdauer entgegenwirken, und damit möglicherweise das Auftreten von Arrhythmien verhindern helfen. Der CLC-3-Kanal wurde als mögliches Kandidatengen für den schwellungs-sensitiven Chloridkanal betrachtet. Um die molekulare Identität des unbekanntes Chloridstromes aufzuklären, wurde untersucht, ob die Mitglieder der CLC-Chloridkanal-Familie in diesem Tiermodell transkriptionell

hochreguliert sind. Außer CLC-3 (Li *et al.*, 2000) besitzt auch CLC-4 auswärtsgleichrichtende Stromeigenschaften (Friedrich *et al.*, 1999). Es konnte allerdings für keines der analysierten CLC-Gene eine auffällige Veränderung in der mRNA-Expression nachgewiesen werden (siehe Abbildung 20, Seite 64). Kürzlich konnte mit Hilfe der CLC-3 Knock-out-Maus eindeutig nachgewiesen werden, dass der CLC-3 nicht der schwellungs-sensitive Chloridkanal ist (Stobrawa *et al.*, 2001). Es ist aus diesem Grund eher unwahrscheinlich, dass der bei kardialer Hypertrophie induzierte Chloridstrom durch einen CLC-Chloridkanal vermittelt wird. Es ist zudem möglich, dass die beobachtete Induktion dieser Chloridleitfähigkeit in den hypertrophierten Myokardzellen nicht auf einer verstärkten Genaktivierung beruht, sondern durch die Aktivierung eines bisher unbekanntes Kanalproteins selber zustande kommt.

### **Genexpression der CLC-Chloridkanäle im Herzinsuffizienz-Modell**

Das ventrikuläre Remodeling nach einem Myokardinfarkt ist eine der wichtigsten Ursachen für die chronische Herzinsuffizienz (Pfeffer *et al.*, 1990). Mit Hilfe eines Rattenmodells (Pfeffer *et al.*, 1979; Goldman *et al.*, 1995) sind die pathophysiologischen Mechanismen, die diesem Prozess zugrunde liegen, untersucht worden. Die Herzinsuffizienz in diesem Rattenmodell ist durch eine erhöhte Zurückhaltung von Wasser charakterisiert, die sehr wahrscheinlich durch eine Hochregulation der mRNA- und Protein-Expression des Wasserkanals Aquaporin-2 in den Nieren verursacht wird (Xu *et al.*, 1997). Der Anstieg der Expression des Wasserkanals wird begleitet von einem Anstieg des Vasopressin-Plasmaspiegels. Da neben dem Aquaporin-2 Kanal auch CLC-K1 an der Konzentrierung des Urins beteiligt ist (Matsumura *et al.*, 1999), wäre eine Veränderung in seiner Genexpression ebenfalls naheliegend. Es konnte aber keine Änderung in der mRNA-Expression von CLC-K1 nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit den an den anderen Tiermodellen erhaltenen Ergebnissen konnte auch in dem insuffizienten Herz keine Änderung des Expressionsmusters für die verschiedenen CLC-Gene gefunden werden (siehe Abbildung 22, Seite 68).

### **Bedeutung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse**

Von einigen CLC-Chloridkanälen ist bekannt, dass sie auf der transkriptionellen Ebene stark reguliert werden können. So wird zum Beispiel CLC-1 während der Reifung der Skelettmuskulatur auf RNA-Ebene hochreguliert (Steinmeyer *et al.*, 1991), und CLC-2 ist während der Reifung der Lunge herunterreguliert (Murray *et al.*, 1995). Außerdem wird die mRNA-Expression von CLC-5 durch das Parathormon in der Nierenrinde hochreguliert (Silva *et al.*, 2000), und die mRNA-Expression von CLC-K1 wird durch Wasserentzug bei den Tieren stark erhöht (Uchida *et al.*, 1993; Vandewalle *et al.*, 1997). Obwohl wir ähnliche Analysemethoden wie in den erwähnten Arbeiten benutzt haben, konnten wir keine Unterschiede in der mRNA-Expression der verschiedenen CLC-Gene in den fünf untersuchten

kardiovaskulären Tiermodellen beobachten. Es lässt sich zwar nicht ganz ausschließen, dass geringe Unterschiede in der mRNA-Expression in unseren Untersuchungen nicht entdeckt wurden, dennoch ist es eher unwahrscheinlich, dass solche geringen Veränderungen einen bedeutenden Beitrag zu den schweren Krankheitsbildern der untersuchten Tiermodelle leisten könnten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle in den untersuchten kardiovaskulären Tiermodellen nicht auffällig verändert wurde. Eine ursächliche Beteiligung der CLC-Chloridkanäle bei den untersuchten Erkrankungen ist deshalb aufgrund dieser Resultate unwahrscheinlich. Die CLC-Chloridkanäle scheinen daher auf den ersten Blick nicht sehr vielversprechend als potentielle Zielgene bei der Behandlung von Bluthochdruck, kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz zu sein. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die CLC-Chloridkanäle in bestimmten Geweberegionen eine Rolle bei diesen Erkrankungen spielen, die in unseren Studien nicht analysiert wurden. Außerdem ist eine Regulation der Chloridkanäle auf einer anderen Ebene, wie der Protein-Expression, möglich. Auch wenn die CLC-Chloridkanäle bei den untersuchten Erkrankungen vielleicht nicht direkt beteiligt sind, könnte die pharmakologische Modulation der Chloridkanalaktivität durchaus therapeutisch sinnvoll sein. So sind beispielsweise Diuretika wichtige Bestandteile der medikamentösen Therapie bei der Herzinsuffizienz. Eine pharmakologische Hemmung der CLC-K-Chloridkanäle hätte aufgrund ihrer renalen Funktionen sehr wahrscheinlich eine starke Natriurese und Diurese zur Folge.

### **4.2 Die CLC-Chloridkanäle und ihre mögliche Bedeutung für die Niereninsuffizienz**

In diesem Abschnitt wird die veränderte Genexpression der CLC-Chloridkanäle in den Nieren der Tiere mit Niereninsuffizienz erläutert. Außerdem werden die Auswirkungen einer medikamentösen Behandlung der Tiere mit einer Substanz, welche bei der Niereninsuffizienz wirksam ist, auf die Genexpression diskutiert.

#### **4.2.1 Die Veränderung der Genexpression der CLC-Chloridkanäle**

Die Unterbrechung des renalen Blutflusses führt zu akuter Ischämie und damit zu akutem Nierenversagen. Die Diagnose des akuten Nierenversagens basiert auf dem Nachweis erhöhter Serumkreatininwerte und einer Verminderung der glomerulären Filtrationsrate. Da das Nierenepithel stark in die Bewegung von Wasser und Ionen involviert ist, sind viele der daran beteiligten Transporter und Ionenkanäle im Rattenmodell der Niereninsuffizienz untersucht worden, und für die meisten wurde eine Reduktion der mRNA-Expression gezeigt.

Trotz einer Verbesserung der glomerulären Filtrationsrate bleibt die mRNA- und Protein-Expression vieler Transporter und Ionenkanäle weiterhin herabgesetzt. Dies könnte zu der gesteigerten Natrium-, Chlorid- und Wasserausscheidung während der Erholungsphase nach einem akuten Nierenversagen beitragen (Anderson und Schrier, 1988). Die Ursachen der Flüssigkeits- und Elektrolytstörungen nach einer akuten tubulären Nekrose könnte neben der Zerstörung von Gewebe also auch in einer komplexen Regulation von Transportsystemen begründet sein. Es lag deshalb nahe, auch die mRNA-Expression der in der Niere exprimierten Mitglieder der CLC-Chloridkanal-Familie zu analysieren. In zwei unabhängigen Tierstudien beobachteten wir eine Abnahme in der mRNA-Expression aller untersuchten CLC-Chloridkanäle. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die mRNA-Mengen in den ersten 32 Stunden nach dem operativen Eingriff am stärksten vermindert waren, und nach 7 bzw. 14 Tagen wieder ihre Ausgangswerte erreichten. Die Rückkehr der mRNA-Expressionswerte zum Ausgangsniveau verlief parallel zu der Normalisierung der Kreatinin- und Harnstoffwerte nach 7 bzw. 14 Tagen. Dies könnte also bedeuten, dass sich die mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle ähnlich verhält wie der Zustand der Nieren, d. h. dass bei einer Verbesserung der Nierenfunktion auch eine Erholung der mRNA-Expression auftritt. Oftmals war zudem ein stärkerer Effekt in der Medulla als im Cortex der niereninsuffizienten Tiere zu erkennen (siehe Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 32, Abbildung 34 und Abbildung 36, auf den Seiten 72, 73, 80, 83 und 86).

Während die Funktionen für die nierenspezifischen Chloridkanäle CLC-5, CLC-K1 und CLC-K2 in der Niere inzwischen gut untersucht sind, trifft dies für die anderen CLC-Chloridkanäle bisher nicht zu. Der Chloridkanal CLC-5 spielt eine wichtige Rolle bei der Endozytose, die deshalb in der Knock-out-Maus beeinträchtigt ist (Piwon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Er ist im proximalen Tubulus zusammen mit der Protonen-ATPase in subapikalen Endosomen lokalisiert. Im Sammelrohr kommt er zusammen mit der Protonen-ATPase in der apikalen Membran von Säure-sezernierenden Zellen vor. Die positive Ladung, die während der Ansäuerung durch die Protonen-ATPase entsteht, kann durch die von CLC-5 erzeugten Chloridströme neutralisiert werden. Auch NHE-3 und der Na-P<sub>i</sub>-Kotransporter sind teilweise in den endozytotischen Kompartimenten vorhanden (Biemesderfer *et al.*, 1997; D'Souza *et al.*, 1998; Murer *et al.*, 1999). Für diese Transporter wurde bereits eine Abnahme der mRNA- und Protein-Expression im Niereninsuffizienz-Modell beschrieben (Wang *et al.*, 1997a; Kwon *et al.*, 2000). In der für CLC-5-defizienten Maus ist die Zelloberflächenexpression dieser Transportproteine ebenfalls vermindert (Piwon *et al.*, 2000). Die Abnahme der Expression von NHE-3 und des Na-P<sub>i</sub>-Kotransporters in der Niereninsuffizienz könnte also durch die verringerte CLC-5-Genexpression verursacht sein.

CLC-K1 ist im dünnen aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife für den transepithelialen Chlorid-Transport und damit für die Konzentrierung des Urins verantwortlich (Uchida *et al.*, 1993; Vandewalle *et al.*, 1997). Bei Funktionsverlust des CLC-K1-Chloridkanals kommt es in der Maus zu einer verminderten Wasserresorption und damit zu einem erhöhten Harnvolumen (Matsumara *et al.*, 1999). Die Abnahme der CLC-K1-mRNA-Expression in unserem Tiermodell könnte an dem verringerten transepithelialen Chlorid-Transport und der damit verbundenen erhöhten Chlorid- und Wasserausscheidung beteiligt sein, die in der Erholungsphase nach dem akuten Nierenversagen beobachtet wird (Anderson und Schrier, 1988).

Im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife wird die Natrium- und Chloridresorption an der apikalen Membran vom  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter vermittelt. Kalium wird durch den Kaliumkanal ROMK in der luminalen Membran zurücktransportiert, während Chlorid die Zelle basolateral durch CLC-Kb/K2-Kanäle verlässt. Mutationen in Genen des CLC-Kb, des  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporters oder des Kaliumkanals ROMK verursachen beim Menschen das Bartter-Syndrom (Simon *et al.*, 1996a, 1996b und 1997). Es wurde bereits gezeigt, dass sowohl die mRNA-Expression des Kaliumkanals ROMK (Gimelreich *et al.*, 2001) als auch die mRNA-Expression des  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporters (Wang *et al.*, 1997b) in dem Tiermodell der Niereninsuffizienz herabgesetzt ist. Somit passt auch die in unserer Studie beobachtete Abnahme der CLC-K2-mRNA-Expression in das bisher bekannte Gesamtbild. Alle Beobachtungen stimmen mit einer erhöhten Ausscheidung von Wasser, Natrium- und Chloridionen in der Erholungsphase nach dem akuten Nierenversagen überein.

Die funktionelle Bedeutung für die anderen Chloridkanäle, CLC-3, CLC-4, CLC-6 und CLC-7, in der Niere ist bisher nicht bekannt. Vermutlich sind sie wie CLC-5 in unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten lokalisiert und damit nicht direkt am transepithelialen Transport beteiligt. Insgesamt kommt es bei der Niereninsuffizienz hauptsächlich zu einer Abnahme der mRNA-Expression für Ionenkanäle und Transporter, und nur in seltenen Fällen kann auch eine kurzzeitige Zunahme der mRNA-Expression erfolgen. Dies könnte eine physiologische Anpassung an die notwendige Senkung des ATP-Verbrauchs sein. Ein weiterer Grund für die verminderte mRNA-Expression könnte auch die teilweise Zerstörung bzw. Nekrose von Nierengewebe sein. So verursacht im Rattenmodell das langanhaltende Abklemmen der abdominalen Aorta auch nach dem Öffnen der Klemmen eine schlechte Wiederdurchblutung des Cortex und der äußeren Medulla (Franklin *et al.*, 1974; Mason *et al.*, 1987). Daraus kann ein medullärer Infarkt resultieren, was die ursprünglichen Schäden in diesem Modell noch weiter verschlimmern würde (Molitoris *et al.*, 2000). Dies könnte die zum Teil stärker verminderte mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle in der Medulla im Vergleich zum Cortex erklären.

#### **4.2.2 Einfluss der NHE-3-Hemmung auf die Genexpression der CLC-Chloridkanäle**

Auf der Suche nach einer wirksamen Substanz zur Bekämpfung des akuten Nierenversagens wurde S3226 entwickelt, eine Substanz, die spezifisch NHE-3 blockiert ( $IC_{50} = 0,02 \mu\text{mol/l}$  für die menschliche Isoform, gemessen *in vitro* in Fibroblasten; Schwark *et al.*, 1998). Die Behandlung der niereninsuffizienten Tiere vor oder nach der Ischämie mit S3226 verringerte den Anstieg der Kreatininwerte und verbesserte die Überlebensrate der Tiere (Hropot *et al.*, 1998 und *im Druck*). Die Halbwertszeit der Substanz beträgt 30 min nach intravenöser Gabe von 10 mg/kg und eine pharmakokinetische Untersuchung ergab, dass nur 10% der Substanz über die Nieren ausgeschieden werden und der größte Teil von S3226 in der Leber metabolisiert wird. Wie bereits beschrieben (Hropot *et al.*, *im Druck*), wurden in unserem Versuch 20 mg/kg zu Beginn der Reperfusion in die Schwanzvene appliziert. Anhand der Kreatinin- und Harnstoffwerte wurde in unserer Studie kein Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren sichtbar, was möglicherweise an der geringen Anzahl der Tiere und dem gewählten Zeitfenster der Messung lag. In den früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die größten Effekte der Substanz auf die Kreatininspiegel erst zwei bis drei Tage nach der Ischämie zu beobachten waren, und dass die Kreatininwerte nach einem Tag im Vergleich zu den Kontrolltieren nur um ca. 10% reduziert waren.

Durch die Behandlung der Tiere mit S3226 sollte überprüft werden, ob eine Verbesserung oder Abschwächung der allgemeinen Symptome auch gleichzeitig eine geringere Abnahme oder eine schnellere Rückkehr zu den Ausgangswerten der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle erreicht werden kann. Insgesamt konnte jedoch kein großer Unterschied zwischen den mit S3226 behandelten niereninsuffizienten Ratten und den mit Placebo behandelten Tieren beobachtet werden. Bei der Auswertung der mRNA-Expression der CLC-Chloridkanäle fiel aber auf, dass 8 Stunden nach der Ischämie die Werte der mRNA-Expression von CLC-3, CLC-5, CLC-7 und CLCK2 in der Medulla der mit S3226 behandelten Tiere im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Tieren erhöht waren. Zur Bestätigung dieser Befunde wurde zu diesem Zeitpunkt die Genexpression in Einzeltieren überprüft (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38, auf den Seiten 88 und 89). Das Resultat ergab, dass die Gabe von S3226 zu diesem frühen Zeitpunkt nach dem akuten Nierenversagen wahrscheinlich einen Einfluss auf die mRNA-Expression einiger CLC-Chloridkanäle hatte. So wurde sowohl bei CLC-3 als auch bei CLC-K2 eine signifikant höhere mRNA-Expression in den mit S3226 behandelten Tieren im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Tieren beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte für CLC-5 und CLC-7 keine signifikante Steigerung der mRNA-Expression erzielt werden, was aber sehr wahrscheinlich an den starken Schwankungen der Einzeltier-Werte lag.

Die erhaltenen Ergebnisse können deshalb nur als Hinweis darauf gedeutet werden, dass die NHE-3-Hemmung eine positive Wirkung auf die Genexpression der CLC-Chloridkanäle hat. Dies würde wiederum bedeuten, dass die Expression einiger CLC-Chloridkanäle direkt mit dem Ausmaß der Niereninsuffizienz korreliert. Um diesen Zusammenhang noch klarer aufzuzeigen, sollte in zukünftigen Studien eine höhere Dosis oder ein potenterer NHE-3-Inhibitor verwendet werden, damit deutlichere Effekte auf die mRNA-Expression der CLC-Gene sichtbar werden.

### **4.3 Kalium- und Kalziumkanal-Untereinheiten und ihre Bedeutung für die atriale Fibrillation**

Das Vorhofflimmern führt zu einer Verkürzung des atrialen Aktionspotentials, zu einer Veränderung der Aktionspotential-Morphologie mit Verlust der Plateauphase und zu elektrophysiologischen und strukturellen Veränderungen. Während dieses Remodeling auf molekularer und zellulärer Ebene bei der chronischen atrialen Fibrillation relativ gut untersucht sind, ist über die Remodelingprozesse der frühen Phase der Arrhythmie noch sehr wenig bekannt. In dem folgenden Abschnitt werden frühe Auswirkungen auf die mRNA-Expression einiger kardialer Kalium- und Kalziumkanal-Untereinheiten in einem neuen Kaninchenmodell für atriale Fibrillation erörtert. Außerdem wird der Zusammenhang zwischen diesen gefundenen Veränderungen und den entsprechenden Änderungen der Kalium- und Kalziumströme diskutiert.

#### **4.3.1 Die Genexpression der Kaliumkanal-Untereinheiten**

Die meisten der bisher beschriebenen mRNA-Expressionsstudien wurden an Patienten mit langanhaltendem Vorhofflimmern (Lai *et al.*, 1999a; Grammer *et al.*, 2000a; Brundel *et al.*, 2001a; Brundel *et al.*, 2001b) oder in verschiedenen Tiermodellen nach längerer schneller Stimulation der Vorhöfe durchgeführt, wie zum Beispiel beim Hund nach 7- oder 42-tägiger Stimulation (Yue *et al.*, 1999), bei der Ziege nach 2-monatiger Stimulation (Van der Velden *et al.*, 2000) oder bei der Ratte nach 2- bis 8-stündiger Stimulationsdauer (Yamashita *et al.*, 2000). Im hier verwendeten Kaninchen-Tiermodell wurde die mRNA-Expression der Kaliumkanal-Untereinheiten erstmals in dem frühen Zeitraum von 6 Stunden bis 4 Tagen untersucht, um die Prozesse zu untersuchen, die beim frühen elektrischen Remodeling eine Rolle spielen (siehe Abbildung 42, Seite 97).

In den Versuchen wurde eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression von Kv4.3 und Kv1.4 im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich. Die mRNA-Expression von Kv4.3 war nach 12-stündiger Stimulationsdauer um ca. 20% vermindert. Für Kv1.4 wurde eine 40%-ige

Verminderung der Genexpression bereits nach 6 Stunden nachgewiesen. Die ebenfalls analysierte Kv4.2 Kaliumkanal-Untereinheit blieb hingegen unverändert. Damit wurde die bereits zuvor beim Patienten und in verschiedenen Tiermodellen (Yue *et al.*, 1999; Grammer *et al.*, 2000a; Yamashita *et al.*, 2000; Brundel *et al.*, 2001a und 2001b) beobachtete Abnahme der mRNA-Expression für Kv4.3 im neuen Kaninchenmodell bestätigt. Das Ausmaß der gefundenen Reduktion der Genexpression im Kaninchenherz stimmte mit dem von Brundel und Mitarbeitern (Brundel *et al.*, 2001a) beim Patienten beschriebenen Wert überein. In anderen Studien, die auch bei Patienten mit chronischem Vorhofflimmern (Abnahme um 61%; Grammer *et al.*, 2000a), beim Hund nach Stimulationsdauer von 42 Tagen (Abnahme um 74%; Yue *et al.*, 1999) und bei der Ratte nach einer kurzen Stimulation von 8 Stunden (Abnahme um ca. 50%; Yamashita *et al.*, 2000) erfolgten, war die Abnahme der Kv4.3 Genexpression aber noch stärker ausgeprägt.

Für Kv4.2 wurde in unserer Studie, entsprechend der im Ziegenmodell gefundenen Resultate (Van der Velden *et al.*, 2000), keine veränderte Genexpression nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer verringerten Kv4.2-mRNA-Expression in der Ratte (Yamashita *et al.*, 2000). Auch die im Menschen und in der Ratte beschriebene unveränderte mRNA-Expression von Kv1.4 (Grammer *et al.*, 2000a; Yamashita *et al.*, 2000) konnte in unserer Studie nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wurde eine Abnahme der Kv1.4-mRNA-Expression im Kaninchenherz beobachtet.

Die zum Teil gegensätzlichen Beobachtungen bezüglich der mRNA-Expression der Kv4.3-, Kv4.2- und Kv1.4-Kaliumkanäle in derselben Spezies bzw. in verschiedenen Spezies lassen sich einerseits durch eine individuelle Variabilität, andererseits durch eine unterschiedliche molekulare Zusammensetzung des kardialen  $I_{to}$ -Kaliumkanals in verschiedenen Spezies erklären. So ist die Kaliumkanal-Untereinheit Kv4.3 sowohl im Menschen als auch im Kaninchen und in der Ratte sehr stark im Herz exprimiert (Serodio *et al.*, 1996; Dixon *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999) und gilt im Menschen als die Hauptkomponente für den kardialen  $I_{to}$ -Kaliumkanal. In Übereinstimmung damit ist die mRNA-Expression von Kv4.3 auch in allen drei Spezies bei atrialer Fibrillation vermindert. Kv4.2 wird hingegen vor allem eine Bedeutung für den  $I_{to}$  in der Ratte zugesprochen (Barry *et al.*, 1995; Dixon und McKinnon, 1994), was eine verringerte mRNA-Expression in der Ratte im Gegensatz zum Patienten oder zum Kaninchen erklärt. Die Kaliumkanal-Untereinheit Kv1.4 spielt im Kaninchen eine wesentliche Rolle beim  $I_{to}$ -Strom (Wang *et al.*, 1999), wodurch sich auch die Abnahme der mRNA-Expression von Kv1.4 in unserem Kaninchenmodell erklären lässt, während seine Expression beim Patienten oder im Rattenmodell nicht verändert ist (Grammer *et al.*, 2000a; Yamashita *et al.*, 2000). Die beim Menschen und in den Tiermodellen für Vorhofflimmern gefundenen Genprofile stimmen

also sehr gut mit der allgemeinen Annahme überein, dass beim Menschen der Kv4.3, in der Ratte Kv4.3 und Kv4.2, und im Kaninchen Kv1.4, Kv4.2 und Kv4.3 an der Bildung des  $I_{to}$ -Stromes beteiligt sind. Die gemeinsame Beteiligung von Kv1.4 und Kv4.3 erklärt auch die starke Abnahme des  $I_{to}$ -Stromes im Kaninchenherzen um 50%, während die Genexpression beider Kanäle zu einem geringeren Prozentsatz vermindert ist. Das Ausmaß der gefundenen Stromreduktion in den Herzzellen des Kaninchens stimmt sehr gut mit der an Herzzellen von Patienten gefundenen Abnahme überein (Van Wagoner *et al.*, 1997; Bosch *et al.*, 1999). Diese Resultate deuten daraufhin, dass die Kaliumkanalgene Kv4.3 und Kv1.4 bei den frühen Prozessen des elektrischen Remodelings bei Vorhofflimmern eine wichtige Rolle spielen.

Für die Kaliumkanal-Untereinheit Kv1.5 wurde im Kaninchen ebenfalls eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression um ca. 50% bereits nach einer Stimulationsdauer von 12 Stunden beobachtet (siehe Abbildung 44, Seite 100). Dies bestätigt bereits veröffentlichte Expressionsstudien mit RNA aus Patienten (Abnahme um ca. 40%; Lai *et al.*, 1999a) und aus der Ziege (Abnahme um 45%; Van der Velden *et al.*, 2000). Außerdem gibt es Untersuchungen, in denen entweder keine Veränderung oder sogar eine Zunahme in der Kv1.5-Genexpression (Grammer *et al.*, 2000a; Yamashita *et al.*, 2000) sowie auch der  $I_{kur}$ -Stromdichte (Van Wagoner *et al.*, 1997; Yue *et al.*, 1997; Bosch *et al.*, 1999; Brundel *et al.*, 2001a) gefunden wurden. Es ist bislang noch nicht gelungen, den  $I_{kur}$ -Strom im Kaninchenherz nachzuweisen, weshalb seine mögliche physiologische Funktion völlig unklar ist. Die mRNA von Kv1.5 ist aber im Kaninchenherz exprimiert und wie hier gezeigt bei der atrialen Fibrillation auch stark herunterreguliert. Dies kann als starker Hinweis auf die Beteiligung von Kv1.5 beim Aktionspotential des Kaninchenherzens und beim frühen elektrischen Remodeling beim Vorhofflimmern gewertet werden.

### 4.3.2 Die Genexpression der Kalziumkanal-Untereinheiten

Veränderungen des L-Typ-Kalziumstromes  $I_{Ca,L}$  haben einen großen Einfluss auf die Aktionspotentialdauer und die Frequenzadaptation der Repolarisation (Li und Nattel, 1997). Die Stromdichte des  $I_{Ca,L}$  ist bei Vorhofflimmern stark vermindert, was zu einer Verringerung des Kalziumeinstromes in die Zelle und zu einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer führt. In den bisher veröffentlichten Untersuchungen zur Genexpression der Kalziumkanal-Untereinheiten wurde RNA aus Patienten mit permanentem oder anfallsartig auftretendem Vorhofflimmern verwendet (Brundel *et al.*, 1999 und 2001a; Lai *et al.*, 1999b; Van Gelder *et al.*, 1999; Grammer *et al.*, 2000b und 2001). Als Tiermodelle wurden Hunde, die für 7 bzw. 42 Tage stimuliert wurden (Yue *et al.*, 1999), oder Ziegen mit chronischer atrialer Fibrillation (Van der Velden *et al.*, 2000) untersucht. In unserer Studie am Rapid-Pacing-Kaninchenmodell

## Diskussion

---

wurde die mRNA-Expression der Kalziumkanal-Untereinheiten alpha1 und alpha2 sowie von CaB2a, CaB2b und CaB3 untersucht (siehe Abbildung 46 und Abbildung 47, auf den Seiten 102 und 103).

Hierbei wurde eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression der wichtigen porenbildenden alpha1-Untereinheit um 40-50% nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden bzw. 4 Tagen beobachtet. Die mRNA-Expressionswerte der Kalziumkanal-Untereinheit alpha2 waren nicht verändert. Die  $\beta$ -Untereinheiten CaB2a und CaB2b, bei denen es sich um zwei Spleißvarianten handelt, und die Untereinheit CaB3 zeigten ebenfalls eine signifikante Abnahme der mRNA-Expression. Die mRNA-Menge von CaB2a war nach 12 Stunden signifikant um 45-55%, die von CaB2b bereits nach 6 Stunden signifikant um ca. 30% und die von CaB3 um ca. 20% vermindert. Die verringerte Genexpression von alpha1 war aufgrund ähnlicher und bereits publizierter Daten zu erwarten, die durch unsere Ergebnisse nochmals bestätigt wurden. So war die mRNA-Expression der Kalziumkanal-Untereinheit  $\alpha_{1c}$  beim Patienten je nach Dauer und Art des Vorhofflimmerns um 15-60% (Brundel *et al.*, 1999 und 2001a; Lai *et al.*, 1999b; Van Gelder *et al.*, 1999; Grammer *et al.*, 2000b und 2001), im Hundemodell um 60-70% (Yue *et al.*, 1999) und im Ziegenmodell um ca. 30% reduziert. Zur Genexpression der alpha2-Untereinheit gibt es zwei widersprüchliche Ergebnisse. Zum einen wurde eine Abnahme der mRNA-Expression der humanen  $\alpha_2/\delta_1$ -Untereinheit um ca. 31% (Grammer *et al.*, 2001), zum anderen aber eine unveränderte mRNA-Expression (Grammer *et al.*, 2000b) beschrieben. Letzteres Ergebnis entspricht unseren Befunden.

Die mRNA-Expression der  $\beta$ -Kalziumkanal-Untereinheiten ist bisher nur in Studien an Patienten beschrieben worden. Hierbei wurde eine Abnahme der mRNA-Expression für die Untereinheiten  $\beta_b$  und  $\beta_c$ , die auch zwei Spleißvarianten darstellen, um ca. 78% gezeigt, während die Untereinheit  $\beta_a$  unverändert war (Grammer *et al.*, 2000b und 2001). Eine Reduktion des Proteingehaltes vervollständigt das Bild und weist auf eine deutlich geringere Anzahl an funktionellen Kanälen in der Zellmembran hin (Brundel *et al.*, 1999 und 2001a). Beim Vergleich der Genexpressionsdaten der Kalziumkanal-Untereinheiten alpha1, CaB2a, CaB2b und CaB3 mit den Daten der Stromdichtemessungen des  $I_{Ca,L}$  im Kaninchen, ergibt sich ein paralleler zeitlicher Verlauf (siehe Abbildung 48, Seite 104). Die fast vollständige Hemmung des kardialen  $I_{Ca,L}$ -Stromes in unserem Kaninchenmodell lässt sich durch die Abnahme der Genexpression aller Kalziumkanal-Untereinheiten, insbesondere aber der der porenbildenden alpha1-Untereinheit erklären.

#### **4.4 Ausblick**

Aufgrund ihrer Beteiligung an wichtigen Prozessen von Herz und Niere, wie der Erregbarkeit des Herzens, der Regulation des Zellvolumens oder dem transepithelialen Transport von Ionen, stellen Ionenkanäle wichtige Zielmoleküle für die Behandlung von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems dar. Ein experimenteller Ansatz, um eine mögliche Beteiligung von Genen an diesen Erkrankungen nachzuweisen, ist die Profilierung der Genexpressionsmuster im krankhaft veränderten Gewebe mit dem Ziel, hochregulierte oder herunterregulierte Gene zu identifizieren. Diese könnten entweder ursächlich an der Entstehung der Erkrankungen oder bei der Ausprägung der Symptome maßgeblich beteiligt sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal Genprofilierungen einer ganzen Ionenkanalfamilie durchgeführt. Alle Mitglieder der CLC-Chloridkanal-Familie, die im Herzen oder in der Niere exprimiert sind, wurden in fünf Tiermodellen für die Indikationen Hypertonie, kardiale Hypertrophie oder Herzinsuffizienz untersucht. Es konnten allerdings keine auffälligen Veränderungen der mRNA-Expression dieser Chloridkanalgene nachgewiesen werden. Dies muss jedoch nicht unbedingt bedeuten, dass CLC-Chloridkanäle keine geeigneten Zielmoleküle für die Behandlung dieser Erkrankungen darstellen. Mit der Analyse der Genexpressionsmuster werden nur quantitative Änderungen der mRNA, das heißt die Regulation auf der Ebene der Transkription erfasst. Eine Regulation kann jedoch genauso wahrscheinlich auf der posttranslationalen Ebene erfolgen. Quantitative Veränderungen der Ionenkanalproteine werden mit der verwendeten Methodik nicht erfasst. Es wäre deshalb notwendig, in zukünftigen Untersuchungen nach möglichen Änderungen in den Chloridkanalproteinen zu schauen. Hierfür wären aber für die einzelnen Chloridkanalproteine spezifische Antikörper notwendig, die derzeit jedoch noch nicht allgemein zur Verfügung stehen.

Im Tiermodell für die Niereninsuffizienz wurde dagegen eine starke Abnahme der mRNA-Expression für alle CLC-Chloridkanäle gezeigt. Inwiefern diese Abnahme mit dem allgemeinen Schweregrad der Niereninsuffizienz korreliert oder die Folge einer komplexen Regulation von vielen Ionenkanälen und Transportern in der Niere ist, ist bisher nicht bekannt. Erste Befunde nach Behandlung der niereninsuffizienten Tiere mit einem NHE-3-Inhibitor deuteten an, dass bei einer verbesserten Nierenfunktion die Abnahme der mRNA-Expression bestimmter CLC-Gene schwächer ausgeprägt ist. Es ist deshalb lohnenswert, diesen möglichen Zusammenhang in Zukunft noch detaillierter zu untersuchen. Die Beobachtung, dass das NHE-3-Gen selbst bei akutem Nierenversagen in seiner Expression reduziert ist, und dass die pharmakologische Hemmung der NHE-3-Aktivität trotzdem noch einen therapeutischen Nutzen aufweist (Hropot *et al.*, 1998 und *im Druck*), lässt die Möglichkeit zu, dass auch die

## Diskussion

---

Inhibition von Chloridkanälen bei dieser Krankheit eine günstige Auswirkung haben könnte. Es wird interessant sein, in zukünftigen Untersuchungen zu sehen, ob spezifische Chloridkanal-Inhibitoren bei der Niereninsuffizienz ein therapeutisches Potential besitzen.

Mit Hilfe des neu etablierten Kaninchenmodells für die atriale Fibrillation konnte erstmals der frühe Verlauf der mRNA-Expression verschiedener Kalium- und Kalziumkanal-Untereinheiten beim Vorhofflimmern analysiert werden. Hierbei wurde eine rasche und signifikante Abnahme der Expression verschiedener Kalium- und Kalziumkanalgene nachgewiesen, die die gleichzeitig beobachtete Abnahme des Kaliumstromes  $I_{to}$  und des L-Typ-Kalziumstromes  $I_{Ca,L}$  erklären kann. Dadurch wird die Annahme unterstützt, dass diese Ionenkanäle eine wichtige Rolle bei den frühen elektrischen Veränderungen in den Herzvorhöfen spielen, die für die Aufrechterhaltung des Vorhofflimmerns wichtig sind.

Die gleichzeitige elektrophysiologische und molekularbiologische Charakterisierung dieses Vorhofflimmermodells konnte somit bereits interessante neue Befunde zu dem elektrischen Remodelingprozess im Herzen liefern, die sehr wahrscheinlich auch auf das Vorhofflimmern beim Menschen übertragbar sind. Das etablierte Kaninchen-Pacing-Modell könnte deshalb ein für die menschliche atriale Fibrillation relevantes Tiermodell darstellen. Die Analyse weiterer, für die Erregbarkeit des Herzens wichtiger Ionenkanäle sollte helfen, die Mechanismen des elektrischen Remodelings auf molekularer Ebene in Zukunft noch besser zu verstehen. Dies könnte letztlich auch zur Entwicklung neuer Therapieansätze führen.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Regulation verschiedener Ionenkanalene bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit Hilfe von Northern Blots, der semiquantitativen RT-PCR-Technik und zum Teil durch elektrophysiologische Untersuchungen analysiert. Ziel war es, solche Gene zu identifizieren, deren mRNA-Spiegel hochreguliert oder herunterreguliert waren, da diese möglicherweise eine wichtige Rolle bei den kardiovaskulären Erkrankungen spielen könnten. Diese Untersuchungen sollten zu einem besseren Verständnis der renalen und kardialen Funktion dieser Ionenkanäle und der Pathogenese der untersuchten Krankheiten beitragen, aber auch helfen, neue Kandidatengene für diese Krankheiten zu identifizieren. Es wurden insgesamt fünf Tiermodelle mit Hypertonie, kardialer Hypertrophie, Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz und Vorhofflimmern untersucht.

Ein Schwerpunkt dieser Untersuchungen waren die CLC-Chloridkanäle, deren kardiovaskuläre Funktionen noch wenig untersucht sind. Die Genprofile der Chloridkanäle CLC-2, CLC-3, CLC-4, CLC-5, CLC-6 und CLC-7 sowie CLC-K1 und CLC-K2 wurden in den Herzen und Nieren der folgenden Tiermodelle analysiert: (1) In spontan hypertensiven Ratten (SHR) und (2) in SH-stroke-prone-Ratten, die eine genetisch bedingte Hypertonie und Herzhypertrophie entwickeln. (3) In salz-sensitiven Dahl-Ratten, die Hypertonie und Herzhypertrophie erst nach einer salzhaltigen Diät, und (4) in Aortic-Banding-Ratten, die nach einem operativen Eingriff Bluthochdruck und kardiale Hypertrophie entwickeln. (5) Schließlich wurde noch ein Rattenmodell untersucht, in dem durch die Ligatur der Koronararterie ein Herzinfarkt induziert wurde, der letztlich zur Herzinsuffizienz führte. In keinem dieser Tiermodelle wurde jedoch eine auffällige Veränderung in der mRNA-Expression der acht untersuchten CLC-Chloridkanäle in den erkrankten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet.

Die CLC-Chloridkanäle wurden ferner in einem Niereninsuffizienz-Modell untersucht, bei dem in Ratten durch Abklemmen der renalen Arterien und Venen ein akutes Nierenversagen und letztlich eine Niereninsuffizienz hervorgerufen wurde. In diesem Tiermodell war bereits eine Herunterregulation vieler anderer Ionenkanäle und Transporter beschrieben worden. In zwei unabhängigen Tierstudien wurde eine unterschiedlich starke Abnahme der mRNA-Expression für die einzelnen CLC-Chloridkanäle beobachtet. In einer weiteren Studie konnte die Behandlung von niereninsuffizienten Ratten mit einem bei Niereninsuffizienz wirksamen Inhibitor des NHE-3-Transports das Ausmaß der Reduktion einzelner CLC-Gene abschwächen. Weitere Studien mit höheren Dosen oder potenteren Substanzen sind notwendig, um diese vorläufigen Befunde zu bestätigen.

## Zusammenfassung

---

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der kardialen Ionenkanaldichten bei einem neuen Kaninchenmodell für Vorhofflimmern, die in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt wurde. Das Vorhofflimmern ist eine sehr häufige Herzerkrankung bei älteren Menschen, und anhand dieses Tiermodells sollten vor allem frühe Prozesse des elektrischen Remodelings, das für das Auftreten und die Aufrechterhaltung des Vorhofflimmerns von Bedeutung ist, untersucht werden. Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR-Analyse konnte in diesem Tiermodell erstmals eine Reduktion der mRNA für die Kaliumkanalgene Kv1.4, Kv4.3 und Kv1.5 sowie für die Kalziumkanalgene  $\alpha 1$ , CaB2a, CaB2b und CaB3 im frühem Stadium des Vorhofflimmerns nachgewiesen werden. Diese Befunde konnten die Resultate von Patch-Clamp-Messungen erklären, die gleichzeitig an der Universität Tübingen an isolierten Vorhofzellen durchgeführt wurden. In diesen Studien wurde in Übereinstimmung mit den erzielten mRNA-Daten eine Abnahme des  $I_{K1}$ -Kaliumstromes und des  $I_{Ca,L}$ -Kalziumstromes nachgewiesen. Mit diesen Untersuchungen konnten frühere Resultate, die auch an Patienten mit chronischem Vorhofflimmern erhoben wurden, bestätigt werden. Die gefundene Regulation zeigt, dass diese Ionenkanalgene eine wichtige Rolle bei dem frühen elektrischen Remodeling spielen und dass das Rapid-Pacing-Kaninchenmodell ein geeignetes Tiermodell für das Vorhofflimmern beim Menschen ist.

## 6 Literaturverzeichnis

Adachi, S., Uchida, S., Ito, H., Hata, M., Hiroe, M., Marumo, F. und Sasaki, S. (1994) Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thin ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. *J. Biol. Chem.* **269**:17677-17683

Adler, D. A., Rugarli, E. I., Lingenfelter, P. A., Tsuchiya, K., Poslinski, D., Liggitt, H. D., Chapman, V. M., Elliott, R. W., Ballabio, A. und Disteché, C. M. (1997) Evidence of evolutionary up-regulation of the single active X chromosome in mammals based on *Cic4* expression levels in *Mus spretus* and *Mus musculus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:9244-9248

Anderson, R. J. und Schrier, R. W. (1988) *Diseases of the kidney*, edited by Schrier, R., Gottschalk, C., Boston/Toronto, Little, Brown, and Co.:1413-1446

Aronson, R. S. (1991) Mechanisms of arrhythmias in ventricular hypertrophy. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **2**:249-261

Ausma, J., Wijffels, M., Thone, F., Wouters, L., Allessie, M. und Borgers, M. (1997) Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* **96**:3157-3163

Barry, D. M., Trimmer, J. S., Merlie, J. P. und Nerbonne, J. M. (1995) Differential expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunits in adult rat heart. Relation to functional K<sup>+</sup> channels? *Circ. Res.* **77**:361-369

Bénitah, J. -P., Gómez, A. M., Delgado, C., Lorente, P. und Lederer, W. J. (1997) A chloride current component induced by hypertrophy in rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **272**:H2500-H2506

Beuckelmann, D., Näbauer, M. und Erdmann, E. (1993) Alterations of K<sup>+</sup> currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ. Res.* **73**:379-385

Biemesderfer, D., Rutherford, P. A., Nagy, T., Pizzonia, J. H., Abu-Alfa, A. K. und Aronson, P. S. (1997) Monoclonal antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *Am. J. Physiol.* **273**:F289-F299

Bösl, M. R., Stein, V., Hübner, C., Zdebik, A.A., Jordt, S.-E., Mukhopadhyay, A. K., Davidoff, M. S., Holstein, A.-F. und Jentsch, T. J. (2001) Male germ cells and photoreceptors, both

## Literaturverzeichnis

---

dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl<sup>-</sup> channel disruption. *EMBO J.* **20**:1289-1299

Bonventre, J. V. (1988) Mediators of ischemic renal injury. *Annu. Rev. Med.* **39**:531-544

Bonventre, J. V., Sukhatme, V. P., Bamberger, M., Ouelette, A. J. und Brown, D. (1991) Localization of the proteon product of the immediate early growth response gene, Egr-1, in the kidney after ischemia and reperfusion. *Cell. Reg.* **2**:251-260

Bonventre, J. V. (1993) Mechanisms of ischemic renal failure. *Kidney. Int.* **43**:1160-1178

Bosch, R. F., Zeng, X. R., Grammer, J. B., Popovic, K., Mewis, C. und Köhlkamp, V. (1999) Ionic mechanisms of electrical remodelling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* **44**:121-131

Bosch, R. F., Grammer, J. B., Köhlkamp, V. und Seipel, L. (2000) Elektrisches Remodeling bei Vorhofflimmern. *Z. Kardiol.* **89**:795-802

Brandt, S. und Jentsch, T. J. (1995) CIC-6 and CIC-7 are two novel broadly expressed members of the CIC family of chloride channels. *FEBS Lett.* **377**:15-20

Britton, F. C., Hatton, W. J., Rossow, C. F., Duan, D., Hume, J. R. und Horowitz, B. (2000) Molecular distribution of volume-regulated chloride channels (CIC-2 and CIC-3) in cardiac tissues. *Am. J. Heart Circ. Physiol.* **279**:H225-H2233

Brown, A. M. (1997) Cardiac potassium channels in health and disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **7**:118-124

Brundel, B. J. J. M., Van Gelder, I. C., Henning, R. H., Tuinenburg, A. E., Deelman, L. E., Tieleman, R. G., Grandjean, J. G., Van Gilst, W. H. und Crijns, H. J. G. M. (1999) Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc. Res.* **42**:443-454

Brundel, B. J. J. M., Van Gelder, I. C., Henning, R. H., Tieleman, R. G., Tuinenburg, A. E., Wietes, M., Grandjean, J. G., Van Gilst, W. H. und Crijns, H. J. G. M. (2001a) Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circulation* **103**:684-690

Brundel, B. J. J. M., Van Gelder, I. C., Henning, R. H., Tuinenburg, A. E., Wietes, M., Grandjean, J. G., Wilde, A. A. M., Van Gilst, W. H. und Crijns, H. J. G. M. (2001b) Alterations in potassium channel gene expression in atria of patients with persistent and paroxysmal atrial

## Literaturverzeichnis

---

- fibrillation: differential regulation of protein and mRNA levels for K<sup>+</sup> channels. *J. Am. Coll. Cardiol.* **37**:926-932
- Buyse, G., Trouet, D., Voets, T., Missiaen, L., Droogmans, G., Nilius, B. und Eggermont, J. (1998) Evidence for the intracellular location of chloride channel (ClC)-type proteins: Co-localization of ClC-6a and ClC-6c with the sarco/endoplasmatic-reticulum Ca<sup>2+</sup> pump SERCA2b. *Biochem. J.* **330**:1015-1021
- Castrop, H., Kramer B. K., Riegger G. A., Kurtz A. und Wolf, K. (2000) Overexpression of chloride channel CLC-K2 mRNA in the renal medulla of Dahl salt-sensitive rats. *J. Hypertens.* **18**:1289-1295
- Catterall, W. A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**:521-555
- Clemo, H. F., Stambler, B. S. und Baumgarten, C. M. (1999) Swelling-activated chloride current is persistently activated in ventricular myocytes from dogs with tachycardia-induced congestive heart failure. *Circ. Res.* **84**:157-165
- Cooper, C. L., Vandaele, S., Barhanin, J., Fosset, M., Lazdunski, M. und Hosey, M. M. (1987) Purification and characterization of the dihydropyridine-sensitive voltage-dependent calcium channel from cardiac tissue. *J. Biol. Chem.* **262**:509-512
- Dahl, L. K., Heine, M. und Tassinari, L. (1962) Role of genetic factors susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion. *Nature* **194**:480-482
- Devuyst, O., Christie, P. T., Courty, P. J, Beauwens, R., Thakker, R. V. (1999) Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum. Mol. Genet.* **8**:247-257
- Dixon, J. E. und McKinnon, D. (1994) Quantitative analysis of potassium channel mRNA expression in atrial and ventricular muscle of rats. *Circ. Res.* **75**:252-260
- Dixon, J. E., Shi, W., Wang, H. S., McDonald, C., Yu, H., Wymore, R. S., Cohen, I. S. und McKinnon, D. (1996) The role of the Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ. Res.* **79**:659-668
- D'Souza, S., Garcia-Cabado, A., Yu, F., Teter, K., Lukacs, G., Skorecki, K., Moore, H.-P., Orłowski, J. und Grinstein, S. (1998) The epithelial sodium-hydrogen antiporter Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>

- exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. *J. Biol. Chem.* **273**:2035-2043
- Duan, D., Winter, C., Cowley, S., Hume, J. R. und Horowitz, B. (1997) Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* **390**:417-421
- Duan, D., Ye, L., Britton, F., Horowitz, B. und Hume, J. R. (2000) A novel anionic inward rectifier in native cardiac myocytes. *Circ. Res.* **86**:e63-e71
- Eberst, R., Dai, S., Klugbauer, N. und Hofmann, F. (1997) Identification and functional characterization of a calcium channel gamma subunit. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* **433**:633-637
- Ellis, S. B., Williams, M. E., Ways, N. R., Brenner, R., Sharp, A. H., Leung, A. T., Campbell, K. P., McKenna, E., Koch, W. J., Hui, A., Schwartz, A. und Harpold, M. M. (1988) Sequence and expression of mRNAs encoding the  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* **241**:1661-1664
- Feld, L. G., Cachero, S., Liew, J. B. V., Zamlauski-Tucker, M. und Noble, B. (1990) Enalapril and renal injury in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **16**:544-554
- Fervenza, F. C., Tsao, T. und Rabkin, R. (1996) Response of the intrarenal insulin-like growth hormone and epidermal growth factor. *Kidney Int.* **49**:344-354
- Fisher, S. E., Black, G. C., Lloyd, S. E., Hatchwell, E., Wrong, O., Thakker, R. V. und Craig, I. W. (1994) Isolation and partial characterization of a chloride channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Hum. Mol. Genet.* **3**:2053-2059
- Franklin, W. A., Ganote, C. E. und Jennings, R. B. (1974) Blood reflow after renal ischemia. Effects of hypertonic mannitol on reflow and tubular necrosis after transient ischemic in the rat. *Arch. Pathol.* **98**:106-111
- Friedrich, T., Breiderhoff, T. und Jentsch, T. J. (1999) Mutational analysis demonstrates that CIC-4 and CIC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J. Biol. Chem.* **274**:896-902
- Frisch, J. und Edelman, A. (1996) Modulation of the hyperpolarization-activated Cl<sup>-</sup> current in human intestinal T84 epithelial cells by phosphorylation. *J. Physiol.* **490**:115-128
- Frisch, J. und Edelman, A. (1997) Osmosensitivity of the hyperpolarization-activated Cl<sup>-</sup> current in human intestinal T84 cells. *Am. J. Physiol.* **272**:C778-C786

## Literaturverzeichnis

---

- Gao, T., Puri, T. S., Gerhardstein, B. L., Chien, A. J., Green, R. D. und Hosey, M. M. (1997) Identification and subcellular localization of the subunits of L-type calcium channels and adenylyl cyclase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **272**:19401-19407
- Gimelreich, D., Popovtzer, M. M., Wald, H., Pizov, G., Berlatzky, Y. und Rubinger, D. (2001) Regulation of ROMK and channel-inducing factor (CHIF) in acute renal failure due to ischemic reperfusion injury. *Kidney Int.* **59**:1812-1820
- Gobé, G., Zhang, X.-J., Willgoss, D. A., Schoch, E., Hogg, N. A. und Endre, Z. H. (2000) Relationship between expression of Bcl-2 genes and growth factors in ischemic acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**:454-467
- Goldman, S. und Raya, T. E. (1995) Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. *J. Card. Fail.* **1**:169-177
- Grammer, J. B., Bosch, R. F., Kühlkamp, V. und Seipel, L. (2000a) Molecular Remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **11**:626-633
- Grammer, J. B., Bosch, R. F., Kühlkamp, V. und Seipel, L. (2000b) Molecular and electrophysiological evidence for „remodeling“ of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel in persistent atrial fibrillation in humans. *Z. Kardiol.* **89** Suppl. 4:IV/23-IV/29
- Grammer, J. B., Zeng, X., Bosch, R. F. und Kühlkamp, V. (2001) Atrial L-type Ca<sup>2+</sup>-channel,  $\beta$ -adrenoreceptor, and 5-hydroxytryptamine type 4 receptor mRNAs in human atrial fibrillation. *Basic Res. Cardiol.* **96**:82-90
- Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M. und Jentsch, T. J. (1992) Regions involved in the opening of CLC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* **360**:759-762
- Günther, W., Lüchow, A., Cluzeaud, F., Vandewalle, A. und Jentsch, T. J. (1998) ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, co-localizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:8075-8080
- Hanke, W. und Miller, C. (1983) Single chloride channels from Torpedo electroplax. *J. Gen. Physiol.* **82**:25-45
- Hille, B. (1992) Ionic channels of excitable membranes. *Sunderland, MA: Sinauer Association Inc. 2<sup>nd</sup> edition*

## Literaturverzeichnis

---

- Hostetter, T. H. und Brenner, B. M. (1988) Renal circulatory and nephron function in experimental acute renal failure. *Acute Renal Failure*, edited by Brenner, B. M., Lazarus, J. M., New York, Churchill Livingstone: 67-89
- Hropot, M., Schwark, J.-R., Jansen, H.-W., Langer, K. H., Lang, H.-J. und Busch, A. E. (1998) S3226, a novel NHE3 blocker, attenuated ischemia-induced acute renal failure in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**: A2958
- Hropot, M., Juretschke, H.-P., Langer, K.-H. und Schwark, J.-R S3226, a novel NHE3 inhibitor, attenuates ischemia-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int.*, im Druck
- Huang, B., Qin, D. und El-Sherif, N. (2000) Early down-regulation of K<sup>+</sup> channel genes and currents in the postinfarction heart. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **11**:1252-1261
- Hullin, R., Singer-Lahat, D., Freichel, M., Biel, M., Dascal, N., Hofmann, F. und Flockerzi, V. (1992) Calcium channel  $\beta$  subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.* **11**:885-890
- Ingelfinger, J. R. und Dzau, V. J. (1991) Molecular biology of renal injury: Emphasis on the role of the renin-angiotensin system. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2** (Suppl.):S9-S20
- Inoko, M., Kihara, Y., Morii, I., Fujiwara, H. und Sasayama, S. (1994) Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Physiol.* **267**:H2471-H2482
- Itter, G., Linz, W., Jung, W., Juretschke, P., Wiemer, G. und Schölkens, B. A. (1998) Severe symptomatic heart failure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **32**:807
- Jaffe, D., Sutherland, L. E., Barker, D. M. und Dahl, L. K. (1970) Effects of chronic excess salt ingestion. Morphologic findings in kidneys of rats with differing genetic susceptibilities to hypertension. *Arch. Pathol.* **90**:1-16
- Jentsch, T. J., Steinmeyer, K. und Schwarz, G. (1990) Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* **348**:510-514
- Jentsch, T. J., Friedrich, T., Schriever, A. und Yamada, H. (1999) The CLC chloride channel family. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* **437**:783-795
- Jordt, S. E. und Jentsch, T. J. (1997) Molecular dissection of gating in the CLC-2 chloride channel. *EMBO J.* **16**:1582-1592

## Literaturverzeichnis

---

- Kääb, S., Dixon, J., Duc, J., Ashen, D., Näbauer, M., Beuckelmann, D. J., Steinbeck, G., McKinnon, D. und Tomaseli, G. F. (1998) Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* **98**:1383-1393
- Kawasaki, M., Uchida, S., Monkawa, T., Miyawaki, A., Mikoshiba, K., Marumo, F. und Sasaki, S. (1994) Cloning and functional expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron* **12**:597-604
- Kawasaki, M., Suzuki, M., Uchida, S., Sasaki, S. und Marumo, F. (1994) Stable and functional expression of the CLC-3 chloride channel in somatic cell lines. *Neuron* **14**:1285-1291
- Keating, M. T. und Sanguinetti, M. C. (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* **104**:569-580
- Kida, Y., Uchida, S., Miyazaki, H., Sasaki, S. und Marumo, F. (2001) Localization of mouse CLC-6 and CLC-7 mRNA and their functional complementation of yeast CLC gene mutant. *Histochem. Cell. Biol.* **115**:189-194
- Kieferle, S., Fong, P., Bens, M., Vandewalle, A. und Jentsch, T. J. (1994) Two highly homologous members of the CLC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:6943-6947
- Kim S. W., Jeon, Y. S., Un Lee, J., Kang, D. G., Kook, H., Ahn, K. Y., Kim, S. Z., Cho, K. W., Kim, N. H., Han, J. S. und Choi, K. C. (2000) Diminished adenylate cyclase activity and aquaporin 2 expression in acute renal failure rats. *Kidney Int.* **57**:1643-1650
- Kirchner, K. A. (1992) Increased loop chloride uptake precedes hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Physiol.* **262**:R263-R268
- Klausner, J. M., Paterson, I. S., Goldman, G., Kobzik, L., Bodzen, C., Lawrence, R., Valeri, C. R., Shepro, D. und Hechtman, B. H. (1989) Post ischemic renal injury is mediated by neutrophils and leukotrienes. *Am. J. Physiol.* **256**:F784-F802
- Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M. und Hofmann, F. (1998) Molecular diversity of the calcium channel alpha 2delta subunit. *J. Neurosci.* **19**:684,691
- Kobayashi, K., Uchida, S., Mizutani, S., Sasaki, S. und Marumo, F. (2001) Developmental expression of CLC-K1 in the postnatal rat kidney. *Histochem. Cell. Biol.* **116**:49-56

## Literaturverzeichnis

---

- Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K. H. und Jentsch, T. J. (1992) The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* **257**:797-800
- Koch, M. C., Ricker, K., Otto, M., Wolf, F., Zoll, B., Lorenz, C., Steinmeyer, K. und Jentsch, T. J. (1993) Evidence for genetic homogeneity in autosomal recessive generalised myotonia (Becker). *J. Med. Genet.* **30**:914-917
- Kornak, U., Bösl, M. R. und Kubisch, C. (1999) Complete genomic structure of the CLCN6 and CLCN7 putative chloride channel genes. *Biophys. Acta* **1447**:100-106
- Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G. und Jentsch, T. J. (2001) Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* **104**:205-215
- Kouchi, I., Zolk, O., Jockenhövel, F., Itter, G., Linz, W., Cremers, B. und Böhm, M. (2000) Increase in  $G_{i\alpha}$  protein accompanies progression of post-infarction remodeling in hypertensive cardiomyopathy. *Hypertension* **36**:42-27
- Kwon, T.-H., Froklaer, J., Han, J. S., Fernandez-Llama, P., Knepper, M. A., Nielsen, S. (1999) Reduced abundance of aquaporins in rats with bilateral ischemia-induced acute renal failure: prevention by  $\alpha$ -MSH. *Am. J. Renal Physiol.* **277**:F413-F427
- Kwon, T.-H., Froklaer, J., Han, J. S., Knepper, M. A. und Nielsen, S. (2000) Decreased abundance of major  $\text{Na}^+$  transporters in kidneys of rats with ischemia-induced acute renal failure. *Am. J. Renal Physiol.* **278**: F925-F939
- Lai, L. P., Su, M. J., Lin, J. L., Lin, F. Y., Tsai, C. H., Chen, Y. S., Tseng, Y. Z., Lien, W. P. und Huang, S. K. S. (1999a) Changes in the mRNA levels of delayed rectifier potassium channels in human atrial fibrillation. *Cardiology* **92**:248-255
- Lai, L. P., Su, M. J., Lin, J. L., Lin, F. Y., Tsai, C. H., Chen, Y. S., Huang, S. K. S., Tseng, Y. Z. und Lien, W. P. (1999b) Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mRNA in human atrial fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban. *J. Am. Coll. Cardiol.* **33**:1231-1237
- Li, G. R. und Nattel, S. (1997) Properties of transmembrane  $\text{Ca}^{2+}$  current at physiological temperatures and relevance to action potential. *Am. J. Physiol.* **272**:H227-H235

## Literaturverzeichnis

---

- Li, X., Shimada, K., Showalter, L. A. und Weinman, S: A. (2000) Biophysical properties of CLC-3 differentiate it from swelling-activated chloride channels in chinese hamster ovary-K1 cells. *J. Biol. Chem.* **275**:35994-35998
- Linz, W., Jessen, T., Becker, R. H. A., Schölkens, B. A. und Wiemer, G. (1997) Long-term ACE inhibition doubles lifespan of hypertensive rats. *Circulation* **96**:3164-3172
- Linz, W., Becker, R. H. A., Schölkens, B. A., Wiemer, G., Kei, M. und Langer, K. H. (1998) Nephroprotection by long-term ACE inhibition with ramipril in spontaneously hypertensive stroke prone rats. *Kidney Int.* **54**:2037-2044
- Linz, W., Wohlfart, P., Schölkens, B. A., Becker, R. H. A., Malinski, T. und Wiemer, G. (1999) Late treatment with ramipril increases survival in old spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **34**:291-295
- Lloyd, S. E., Pearce, S. H. S., Fisher, S. E., Steinmeyer, K., Schwappach, B., Scheinmann, S. J., Harding, B., Bolino, M., Devoto, M., Goodyer, P., Redgen, S. P. A., Wrong, O., Jentsch, T. J., Craig, I. W. und Thakker, R. V. (1996) A common molecular basis of three inherited kidney stone diseases. *Nature* **379**:445-449
- Lue, W. und Boyden, P. (1992) Abnormal electrical properties of myocytes from chronically infarcted canine heart. *Circulation* **85**:1175-1188
- Luyckx, V. A., Goda, F. O., Mount, B., Nishio, T., Hall, A., Hebert, S. C., Hammond, T. G., Yu, A. S. (1998) Intrarenal and subcellular localization of rat CLC5. *Am. J. Physiol.* **275**:F761-F769
- Malinowska, D. H., Kupert, E. Y., Bahinsky, A., Sherry, A. M. und Cupoletti, J. (1997) Cloning, functional expression, and characterization of a PKA-activated gastric Cl<sup>-</sup> channel. *Am. J. Physiol.* **268**:C191-C200
- Mason, J., Welsch, J. und Torhorst, J. (1987) The contribution of vascular obstruction to the functional defect that follows renal ischemia. *Kidney Int.* **31**:65-71
- Matsumara, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S. B. H., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S. und Marumo, F. (1999) Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat. Genet.* **21**:95-98
- Mays, D. J., Foose, J. M., Philipson, L. H. und Tamkun, M. M. (1995) Localization of the Kv1.5 K<sup>+</sup> channel protein in explanted cardiac tissue. *J. Clin. Invest.* **96**:282-292
- McKinnon, D. (1999) Molecular identity of I<sub>0</sub>: Kv1.4 redux. *Circ. Res.* **84**:620-622

## Literaturverzeichnis

---

- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Marumiya, S., und Numa, S. (1989) Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* **340**:230-233
- Miller, C. und White, M. M. (1982) Open-state subconductance of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.* **299**:401-411
- Mindell, J. A., Maduke, M., Miller, C. und Grigorieff, N. (2001) Projection structure of a ClC-type chloride channel at 6.5 Å resolution. *Nature* **409**:219-223
- Molitoris, B. A., Weinberg, J. M., Venkatachalam, M. A., Zager, R. A., Nath, K. A. und Goligorsky, S. (2000) Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am. J. Physiol.* **278**:F1-F12
- Morillo, C. A., Klein, G. J., Jones, D. L. und Guiraudon, C. M. (1995) Chronic atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* **91**:1588-1595
- Morimoto, T., Uchida, S., Sakamoto, H., Kondo, Y., Hanamizu, H., Fukui, M., Tomino, Y., Nagano, N., Sasaki, S. und Marumo, F. (1998) Mutations in CLCN5 chloride channel in Japanese patients with low molecular weight proteinuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**:811-818
- Mulvaney, A. W., Spencer, C. I., Culliford, S., Borg, J. J., Davies, S. G. und Kozlowski, R. Z. (2000) Cardiac chloride channels: physiology, pharmacology and approaches for identifying novel modulators of activity. *Drug Discov. Today* **5**:492-505
- Murer, H., Forster, I., Hernando, N., Lambert, G., Traebert, M. und Biber J. (1999) Posttranscriptional regulation of the proximal tubule NaPi-II transporter in response to PTH and dietary P<sub>i</sub>. *Am. J. Physiol.* **277**:F676-F684
- Murray, C. B., Morales, M. M., Flotte, T. R., McGrath-Morrow, S., Guggino, W. B. und Zeitlin, P. L. (1995) CLC-2: A developmentally dependent chloride channel expressed in the fetal lung and downregulated after birth. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **12**:597-604
- Näbauer, M., Beuckelmann, D. J., Ueberfuhr, P. und Steinbeck, G. (1996) Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* **93**:168-177

## Literaturverzeichnis

---

- National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee (1997) The sixth report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch. Intern. Med.* **157**:2413-2446
- Nigam, S. K. und Lieberthal, W. (2000) Acute renal failure. III. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *Am. J. Physiol.* **279**:F3-F11
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M. A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T. und Numa, S. (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **299**:793-797
- Ogawa, T., Linz, W., Stevenson, M., Bruneau, B. G., Kuroski de Bold, M. L., Chen, J. H., Eid, H., Schölkens, B. A. und de Bold, A. J. (1996) Evidence for load-dependent and load independent determinants of cardiac natriuretic peptide production. *Circulation* **93**:2059-2067
- Ogawa, T., Linz, W., Schölkens, B. A. und de Bold, A. J. (1998) Regulation of aortic natriuretic factor and angiotensinogen in experimental hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **32**:1001-1008
- Okada, Y. (1997) Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl<sup>-</sup> channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am. J. Physiol.* **273**:C755-C789
- Okamoto, K., Yamori, Y. und Nagaoka, A. (1974) Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circ. Res.* **34-35** Suppl. I:1143-1153
- Okamoto, K., Hazama, F., Yamori, Y. und Nagaoka, A. (1975) Pathogenesis and prevention of stroke in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci. Mol. Med.* Suppl. **2**:161s-163s
- Oliver, J., MacDowell, M. und Tracy, A. (1951) The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury. *J. Clin. Invest.* **30**:1307-1314
- Ouellette, A. J., Malt, R. A., Sukhatme, V. P. und Bonventre, J. V. (1990) Expression of two „immediate early“ genes, Egr-1 and c-fos, in response to renal ischemia and during compensatory renal hypertrophy in mice. *J. Clin. Invest.* **85**:766-771
- Pauli, B. U., Abdel-Ghany, M., Cheng, H.-C., Gruber, A. D., Archibald, H. A. und Elble, R. C. (2000) Molecular characteristics and functional diversity of CLCA family members. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **27**:901-905

## Literaturverzeichnis

---

- Pfeffer, J. M., Pfeffer, M. A., Fishbein, M. C. und Frohlich, E. D. (1979a) function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Physiol.* **237**:H461-H468
- Pfeffer, M. A., Pfeffer, J. M., Fishbein, M. C., Fletcher, P. J., Spadaro, J., Kloner, R. A. und Braunwald, E. (1979b) Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ. Res.* **44**:503-512
- Pfeffer, M. A., Pfeffer, J., Mirsky, I. und Iwai, J. (1984) Cardiac hypertrophy and performance of Dahl hypertensive rats on graded salt diets. *Hypertension* **6**:475-481
- Pfeffer, M. A. und Braunwald, E. (1990) Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation* **81**:1161-1172
- Pichler, M., Cassidy, T. N., Reimer, D., Haase, H., Kraus, R., Ostler, D. und Striessnig, J. (1997) Beta subunit heterogeneity in neuronal L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* **272**:13877-13882
- Pitt, B., Cohn, J. N., Francis, G. S., Kostis, J. B., Packer, M., Pfeffer, M. A., Swedberg, K. und Yusuf, S. (1992) The effect of treatment on survival in congestive heart failure. *Clin. Cardiol.* **15**:323-329
- Piwon, N., Günther, W., Schwake, M., Bösl, M. R. und Jentsch, T. J. (2000) CIC-5 Cl<sup>-</sup> channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* **408**:369-373
- Po, S., Snyders, D. J., Baker, R., Tamkun, M. M., Bennett, P. B. (1992) Functional expression of an inactivating potassium channel cloned from human heart. *Circ. Res.* **71**:732-736
- Pusch, M. und Jentsch, T. J. (1994) Molecular physiology of voltage gated chloride channels. *Physiol. Rev.* **74**:813-827
- Rabb, H., Mendiola, C. C., Saba, S. R., Dietz, J. R., Smith, C. W., Bonventre, J. V. und Ramirez, G. (1995) Antibodies to ICAM-1 protect kidneys in ischemic reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **221**:67-73
- Racusen, L. C. (1995) Renal histopathology and urine cytology and cytopathology in acute renal failure. *Acute renal Failure: New Concepts and Therapeutic Strategies*, edited by Goligorsky, M. S., Stein, J. H., New York, Churchill Livingstone: 193-229
- Rapp, J. P., McPartland, R. P. und Sustarsic, D. L. (1980) A qualitative difference in plasma renin activity in Dahl rats susceptible or resistant to salt-induced hypertension. *Biochem. Genet.* **18**:1087-1096

## Literaturverzeichnis

---

- Reeves, W. B. und Andreoli, T. E. (1992) Renal epithelial chloride channels. *Annu. Rev. Physiol.* **54**:29-50
- Roden, D. M. (1998) Mechanisms and management of proarrhythmia. *Am. J. Cardiol.* **82**:491-571
- Roman, R. J. und Kaldunski, M. L. (1991) Enhanced chloride reabsorption in the loop of Henle in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* **17**:1018-1024
- Roman, R. M., Smith, R. L., Feranchak, A. P., Clayton, G. H., Doctor, R. B. und Fitz, J. G. (2001) CIC-2 chloride channels contribute to HTC cell volume homeostasis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**:G344-G353
- Rosenberg, M. E. und Paller, M. S. (1991) Differential gene expression in the recovery from ischemic renal injury. *Kidney Int.* **39**:1156-1161
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467
- Scheinman, S. J. (1998) X-linked hypercalciuric nephrolithiasis: Clinical syndromes and chloride channel mutations. *Kidney Int.* **53**:3-17
- Schmidt-Rose, T. und Jentsch, T. J. (1997) Transmembrane topology of a CLC chloride channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:7633-7638
- Schwiebert, E. M., Cid-Soto, L. P., Stafford, T., Carter, M., Blaisdell, C. J., Zeitlin, P. L., Guggino, W. B. and Cutting, G. R. (1998) Analysis of CLC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:3879-3884
- Semb, S. O., Lunde, P. K., Holt, E., Tonnessen, T., Christensen, G. und Sejersted, O. M. (1998) Reduced myocardial Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-pump capacity in congestive heart failure following myocardial infarctions in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**:1311-1328

## Literaturverzeichnis

---

- Serodio, P., Demiera, E. V. S. und Rudy, B. (1996) Cloning of a novel component of the A-type K<sup>+</sup> channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J. Neurophysiol.* **75**:2174-2179
- Sgard, F., Faure, C., Drieu la Rochelle, C., Graham, D., O'Connor, S. E., Janiak, P. und Besnard, F. (2000) Regulation of ATP-sensitive potassium channel mRNA expression in rat kidney following ischemic injury. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **269**:618-622
- Sherry, A. M., Stroffekova, K., Knapp, L. M., Kupert, E. Y., Cupoletti, J. und Malinowska, D. H. (1997) Characterization of the human pH- and PKA-activated ClC-2G(2 $\alpha$ )Cl<sup>-</sup> channel. *Am. J. Physiol.* **273**:C384-C393
- Silva, S., Blaisdell, C. J., Guggino, S. E. und Guggino, W. B. (2000) PTH regulates expression of CLC-5 chloride channel in the kidney. *Am. J. Physiol.* **278**:F238-F245
- Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., Di Pietro, A., Sanjad, S. A. und Lifton, R. P. (1996a) Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat. Genet.* **13**:183-188
- Simon, D. B., Karet, F. E., Rodriguez-Soriano, J., Hamdan, J. M., Di Pietro, A., Trachtman, H., Sanjad, S. A. und Lifton, R. P. (1996b) Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K<sup>+</sup> channel ROMK. *Nat. Genet.* **14**:152-156
- Simon, D. B., Bindra, R. S., Mansfield, T. A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J. M., Sanjad, S. A., Taylor, C. M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G. A., John, E. und Lifton, R. P. (1997) Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* **17**:171-178
- Shimada, K., Li, X., Xu, G., Nowak, D. E., Showalter, L. A. und Weinman, S. A. (2000) Expression and canalicular localization of two isoforms of the ClC-3 chloride channel from rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* **279**:G268-G276
- Smith, R. L., Clayton, C. L., Wilcox, C. L., Escudero, K. W und Staley, K. J. (1995) Differential expression of inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *J. Neurosci.* **15**:4057-4067
- Snyders, D. J. (1999) Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* **42**:377-390

## Literaturverzeichnis

---

- Sorota, S. (1999) Insights into the structure, distribution and function of the cardiac chloride channels. *Cardiovasc. Res.* **42**:361-376
- Staley, K. J., Smith, R. L., Schaack, J., Wilcox, C. L. und Jentsch, T. J. (1996) Alteration of GABA<sub>A</sub> receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron* **17**:543-551
- Steinmeyer, K., Ortland, C. und Jentsch, T. J. (1991a) Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* **354**:301-304
- Steinmeyer, K., Klocke, R., Ortland, C., Gronemeier, M., Jockusch, H., Gründer, S. und Jentsch, T. J. (1991b) Inactivation of muscle chloride channel by transposons insertion in myotonic mice. *Nature* **354**:304-308
- Steinmeyer, K., Lorenz C., Pusch, M., Koch, M. C. und Jentsch, T. J. (1994) Multimeric structure of ClC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomson). *EMBO J.* **13**:737-743
- Steinmeyer, K., Schwappach, B., Bens, M., Vandewalle, A. und Jentsch, T. J. (1995) Cloning and functional expression of rat ClC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J. Biol. Chem.* **270**:31172-31177
- Stobrawa, S. M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A. A., Bösl, M. R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A. und Jentsch, T. J. (2001) Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* **29**:185-196
- Striessnig, J. (1999) Pharmacology, structure and function of cardiac L-Type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell. Physiol. Biochem.* **9**:242-269
- Takimoto, K., Li, D., Nerbonne, J. M. und Levitan, E. S. (1997) Distribution, splicing, and glucocorticoid-induced expression of cardiac alpha1C and alpha1D voltage-gated calcium channel mRNAs. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**:3035-3042
- Tamkun, M. M., Knoth, K. M., Walbridge, J. A., Kroemer, H., Roden, D. M. und Glover, D. M. (1991) Molecular cloning and characterization of two voltage-gated K<sup>+</sup> channel cDNAs from human ventricle. *FASEB J.* **5**:331-337
- The Laboratory rat, von George J. Krinke (1999) *Academic Press*

## Literaturverzeichnis

---

- Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M. und Jentsch, T. J. (1992) A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* **356**:57-60
- Trippodo, N. C. und Frohlich, E. D. (1981) Similarities of genetic (spontaneous) hypertension: man and rat. *Circ. Res.* **48**:309-319
- Uchida, S., Sasaki, S., Furukawa, T., Hiraoka, M., Imai, T., Hirata, Y. und Marumo, F. (1993) Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *J. Biol. Chem.* **268**:3821-3824
- Uchida, S., Sasaki, S., Nitta, K., Uchida, K., Horita, S., Nihei, H. und Marumo, F. (1995) Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1. *J. Clin. Invest.* **95**:104-113
- Van der Velden, H. M. W., Van der Zee, L., Wijffels, M. C. E. F., Van Leuven, C., Dorland, R., Vos, M. A., Jongasma, H. J. und Allessie, M. A. (2000) Atrial fibrillation in the goat induces changes on monophasic action potential and mRNA expression of ion channels involved in repolarization. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **11**:1262-1269
- Vandewalle, A., Cluzeaud, F., Bens, M., Kieferle, S., Steinmeyer, K. und Jentsch, T. J. (1997) Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney. *Am. J. Physiol.* **272**:F678-F688
- Van Gelder, I. C., Brundel, B. J. J. M., Henning, R. H., Tuinenburg, A. E., Tieleman, R. G., Deelman, L., Grandjean, J. G., de Kam, P. J., van Gielst, W. H. und Crijns, H. J. G. M. (1999) Alterations in gene expression of proteins involved in the calcium handling in patients with atrial fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **10**:552-560
- Van Slegtenhorst, M. A., Bassi, M. T., Borsani, G., Wapenaar, M. C., Ferrero, G. B., de Conciliis, L., Rugarli, E. I., Grillo, A., Franco, B., Zoghni, H. Y. und Ballabio, A. (1994) A gene from the Xp22.3 region shares homology with voltage-gated chloride channels. *Hum. Mol. Genet.* **3**:547-552
- Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., McCarthy, P. M., Trimmer, J. S. und Nerbonne, J. M. (1997) Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ. Res.* **80**:772-781
- Vaughan Williams, E. M. (1979) Classification of antiarrhythmic drugs. In: Sandoe E, Flensted-Jensen E, Olsen KH: *Cardiac arrhythmias. Sodertalje, Sweden, Astra*:449-472

## Literaturverzeichnis

---

- Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**:615-619.
- Waldegger, S. und Jentsch, T. J., (2000) From tonus to tonicity: Physiology of CLC chloride channels. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**:1331-1339
- Wallace, D. M. (1987) Large- and small-scale phenol extractions. In: Methods in Enzymology 152: guide to molecular cloning techniques (Hrsg. Berger SL und Kimmel AR) *Academic Press*, Orlando, 33-41
- Wang, S. S., Devuyst, O., Courtoy, P. J., Wang, X.-T., Wang, H., Wang, Y., Thakker, R. V., Guggino, S. und Guggino, W. B. (2000) Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Hum. Mol. Genet.* **9**:2937-2945
- Wang, Z., Fermini, B. und Nattel, S. (1993) Sustained depolarisation-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier  $K^+$  current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ. Res.* **73**:1061-1076
- Wang, Z., Rabb, H., Craig, T., Burnham, C., Shull, G. E. und Soleimani, M. (1997a) Ischemic-reperfusion injury in the kidney: overexpression of colonic  $H^+$ - $K^+$ -ATPase and suppression of NHE-3. *Kidney Int.* **51**: 1106-1115
- Wang, Z., Rabb, H., Haq, M., Shull, G. E. und Soleimani, M. (1997b) A possible molecular basis of natriuresis during ischemic-reperfusion injury in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**: 605-613
- Wang, Z., Feng, J., Shi, H., Pond, A., Nerbonne, J. M. und Nattel, S. (1999) Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward  $K^+$  current in rabbit and human atrial myocytes. *Circ. Res.* **84**:551-561
- Wickenden, A. D., Jegla, T. J., Kaprielian, R. und Backx, P. H. (1999) Regional contributions of Kv1.4, Kv4.2 and Kv4.3 to transient outward  $K^+$  current in rat ventricle. *Am. J. Physiol.* **276**:H1599-F1607
- Wijffels, M. C., Kirchhof, C. J., Dorland, R. und Allessie, M. A. (1995) Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* **92**:1954-1968

## Literaturverzeichnis

---

- Winters, C. J., Zimniak, L., Reeves, W. B. und Andreoli, T. E. (1997) Cl<sup>-</sup> channels in basolateral renal medullary membranes. XII. Anti-rbClC-Ka antibody blocks MTAL Cl<sup>-</sup> channels. *Am. J. Physiol.* **273**:F1030-F1038
- Xu, D.-L., Martin, P.-Y., Ohara, M., St. John, J., Pattison, T., Meng, X., Morris, K., Kim, J. K. und Schrier, R. W. (1997) Upregulation of aquaporin-2 water channel expression in chronic heart failure rat. *J. Clin. Invest.* **99**:1500-1505
- Xu, H., Barry, D. M., Li, H., Brunet, S., Guo, W. und Nerbonne, J. M. (1999a) Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative Kv2  $\alpha$  subunit. *Circulation* **85**:623-633
- Xu, H., Guo, W. und Nerbonne, J. M. (1999b) Four kinetically distinct depolarization activated K<sup>+</sup> channel currents in mouse ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* **113**:661-678
- Yamashita, T., Murakawa, Y., Hayami, N., Fukui, E., Kasaoka, Y., Inoue, M. und Omata, M. (2000) Short-term effects of rapid pacing on mRNA level of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in rat atrium. *Circulation* **101**:2007-2014
- Yeola, S. W. und Snyders, D. J. (1997) Electrophysiological and pharmacological correspondence between Kv4.2 current and rat cardiac transient outward current. *Cardiovasc. Res.* **33**:540-547
- Yoshikawa, M., Uchida, S., Yamauchi, A., Miyai, A., Tanaka, Y., Sasaki, S. und Marumo, F. (1999) Localization of rat CLC-K2 chloride channel mRNA in the kidney. *Am. J. Physiol.* **276**:F552-F558
- Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G. R., Wang, Z. und Nattel, S. (1997) Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ. Res.* **81**:512-525
- Yue, L., Melnyk, P., Gaspo, R., Wang, Z. und Nattel, S. (1999) Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ. Res.* **84**:776-784

## 7 Veröffentlichungen

### Originalveröffentlichungen

Lerche, C.\*, **Scherer, C. R.\***, Seeböhm, G., Derst, C., Wei, A. D., Busch, A. E. und Steinmeyer, K. (2000) Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J. Biol. Chem.* **275**:22395-22400

Lerche, C., Seeböhm, G., Wagner, C. I., **Scherer, C. R.**, Dehmelt, L., Abitbol, I., Gerlach, U., Brendel, J., Attali, B. und Busch, A. E. (2000) Molecular impact of MinK on the enantiospecific block of  $I_{Ks}$  by chromanols. *Brit. J. Pharmacol.* **131** :1503-1506

Seeböhm, G., **Scherer, C. R.**, Busch, A. E. und Lerche, C. (2001) Identification of specific pore residues mediating KCNQ1-inactivation: a novel mechanism for long QT-syndrome? *J. Biol. Chem.* **276**:13600-13605

Decher, N., Uyguner, O., **Scherer, C. R.**, Karaman, B., Yüksel-Apak, M., Busch, A. E., Steinmeyer, K. und Wollnik, B. (2001) hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: Cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc. Res.* **52**:255-264

**Scherer, C. R.**, Linz, W., Busch, A. E. und Steinmeyer, K. (2001) Gene expression profiles of CLC chloride channels in animal models with different cardiovascular diseases. *Cell. Physiol. and Biochem.* **11**:6:321-330

Bosch, F. R.\*, **Scherer, C. R.\***, Rüb, N., Woehrl, S., Steinmeyer, K., Busch, A. E., Seipel, L. und Kühlkamp, V. Molecular mechanisms of early electrical remodeling – transcriptional downregulation of ion channel subunits reduces  $I_{CaL}$  and  $I_{to}$  in rapid pacing in rabbits. *Eingereicht*

Niedernberg, A., Gassenhuber, J., **Scherer, C. R.**, Stillger, U., Busch, A. E. und Kostenis, E. Differential expression and pharmacological properties of the sphingosine-1-phosphate receptor homologues human and rat EDG8. *Eingereicht*

**Scherer, C. R.\***, Lerche, C.\*, Pinto, Y. M., Busch, A. E. und Steinmeyer, K. The antihistamine fexofenadine does not affect  $I_{Kr}$ -currents in a patient reported to have fexofenadine-induced cardiac arrhythmia. *Eingereicht*

\* Die Autoren haben den gleichen Anteil an der Arbeit.

**Kongressbeiträge**

**Scherer, C. R.**, Lerche, C., Pinto, Y. M., Busch, A. E. und Steinmeyer, K. (2000) The antihistamine fexofenadine does not affect  $I_{Kr}$ -currents in a patient reported to have fexofenadine-induced cardiac arrhythmia. *Biophys. J.* **78**:342A

**Scherer, C. R.**, Lerche, C., Pinto, Y. M., Busch, A. E. und Steinmeyer, K. (2000) The antihistamine fexofenadine does not affect cardiac  $I_{Kr}$  currents: a functional study of wild-type and a novel HERG mutant identified in a patient reported to have drug-induced cardiac arrhythmia. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **361**, Suppl.: R78

Wollnik, B., Decher, N., Uyguner, O., Karaman, B., **Scherer, C. R.**, Ghanbari, A., Yüksel-Apak, M. und Steinmeyer, K. (2001) Functional and molecular characterization of the cardiac transient outward current  $I_{to}$  and its putative implication in cardiac arrhythmias. *European J. Hum. Genet.* **9**, Suppl. 1:245

**Scherer, C. R.**, Linz, W., Busch, A. E. und Steinmeyer, K. (2001) Gene expression profiles of CLC chloride channels in animal models with different cardiovascular diseases. *European J. Physiol.* **441**, Suppl.: P44-6

Arndt, P., Margerie, D., **Scherer, C. R.**, Jansen, H. -W. und Busch, A. E. (2001) Identification and cloning of three novel potential sodium/bicarbonate cotransporters by a bioinformatical approach. *European J. Physiol.* **441**, Suppl.: P29-5

Bosch, F. R., Rüb, N., **Scherer, C. R.**, Woehrl, S., Schneck, A. C., Neuberger, H.-R., Mewis, C., Steinmeyer, K., Seipel, L. und Köhlkamp, V. (2001) Molecular mechanisms of very early phases of atrial electrical remodeling – transcriptional downregulation of ion channel subunits reduces  $I_{CaL}$  and  $I_{to}$  currents. *Circulation* **104**, Suppl.: 641

## Danksagung

---

### **Danksagung**

Die vorliegende Dissertation wurde als externe Doktorarbeit in der Abteilung Cardiovascular Diseases der Aventis Pharma Deutschland GmbH in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Prof. Dr. Andreas E. Busch und PD Dr. Klaus Steinmeyer angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt:

PD Dr. Klaus Steinmeyer für die freundliche Unterstützung und kompetente fachliche Betreuung der Doktorarbeit.

Prof. Dr. Andreas E. Busch für das Bereitstellen des Themas und die Betreuung der Arbeit sowie seine sehr zuverlässige Unterstützung

Prof. Dr. Dr. Ernst Mutschler von der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main für die freundliche Betreuung und die Begutachtung meiner Arbeit, durch die diese Dissertation erst ermöglicht wurde.

Christian Lerche für die geduldige Einarbeitung in die molekularbiologischen Techniken, motivierende Gespräche und die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei gemeinsamen Projekten.

PD Dr. Markus Bleich und PD Dr. Wolfgang Linz für die Bereitstellung der Tiermodelle sowie hilfreiche Diskussionen und Anregungen.

Dr. Ralph Bosch und Norman Rüb von der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und die Bereitstellung der elektrophysiologischen Daten des Kaninchenmodells.

Yvonne Lorat für die tatkräftige Unterstützung während ihres Praktikums in unserem Labor.  
Inge Kress-Fischer, Ursula Stillger und Elsa Kern für die nette Atmosphäre im Labor.

Dr. Petra Arndt, Anke Niedernberg, Karen Menning, Dr. Jochen Huber, Dr. Alexander Bachmann, Guiscard Seebohm, Dr. Evi Kostenis und Dr. Pearly Lee für die hilfreiche Unterstützung in allen Lebenslagen sowie für interessante Diskussionen und Gespräche.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

## 8 Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Constanze Scherer  
Wohnort: Frankfurt am Main  
Geburtstag: 01. Mai 1973  
Geburtsort: Tübingen

### Ausbildung

1979-1983 Grundschole in Tübingen

1983-1992 Uhland-Gymnasium in Tübingen  
Abitur 1992

1993-1998 Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen, 3. Staatsexamen (bei Prof. Dr. H. P. T. Ammon, Prof.  
Dr. J. Schultz, Prof. Dr. L. Heide und Prof. Dr. P. C. Schmidt)  
und Approbation zur Apothekerin im Juli 1998

seit August 1998 Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Abteilung  
Cardiovascular Diseases der Aventis Pharma Deutschland  
GmbH in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Herrn Prof.  
Dr. A. E. Busch und Herrn Prof. Dr. Dr. med. E. Mutschler

### Praktika

August 1993 Famulatur in der Apotheke des Städtischen Krankenhauses  
Bogenhausen, München

März 1994 Famulatur in der Mayerschen Apotheke, Tübingen

1997-1998 Pharmaziepraktikum in der Bahnhof-Apotheke, Rottenburg

### Auslandsaufenthalt

Mai – November 1997 im Rahmen des Praktischen Jahres Aufenthalt in der  
Krankenhausapotheke des Valley Children's Hospital,  
Fresno/USA