

Aus dem Physiologischen Institut  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. S. Silbernagl

**Transfektion migrierender Nierenepithelzellen  
mit dem K<sup>+</sup>-Kanal ROMK2**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Dietmar Thomas Weinhold  
aus Memmingen

Würzburg, Juni 2001

Referent: Prof. Dr. med. A. Schwab  
Korreferent: Prof. Dr. med. S. Silbernagl  
Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2002

Der Promovend ist Zahnarzt.

Gewidmet meiner Familie.

Wenn jemand nach reicher Erfahrung strebt:/  
sie kennt das Vergangene und errät das  
Kommende, sie versteht die Worte schön  
zu formen und Rätselhaftes zu deuten;/  
sie weiß im Voraus Zeichen und Wunder/  
und kennt den Ausgang von Perioden und Zeiten.

WEISH 8, 8

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>6</b>
2.1 Zellkultur	6
2.2 Stabile Transfektion	7
2.3 RNA-Isolation	8
2.4 cDNA-Synthese	9
2.5 Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR)	9
2.6 Gelelektrophorese	10
2.7 Umklonierung des PCR-Produkts	11
2.8 Migrationsexperimente	13
2.9 Patch-Clamp-Experimente	14
2.10 Immunfluoreszenzversuche	18
2.11 Statistik	19
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>20</b>
3.1 Stabile Transfektion	20
3.2 RT-PCR-Versuche	21
3.3 Patch-Clamp-Experimente	23
3.4 Migrationsexperimente	27
3.5 Verteilung des ROMK2 in migrierenden MDCK-F-Zellen	28
<b>4. Diskussion</b>	<b>30</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>33</b>
Abkürzungen	35
Literaturverzeichnis	36
Danksagung	
Lebenslauf	

## 1. Einleitung

Die Migration von Zellen spielt im Säugerorganismus bei einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Beispiele sind die Wundheilung, die Immunabwehr und die Embryogenese, sowie die Ausbildung von Tumormetastasen. Bei der Wundheilung kommt es zu einer Einwanderung von epidermalen Keratinozyten von den Wundrändern in das Wundgebiet, um das betroffene Areal zu verschliessen. Dadurch wird der Organismus vor dem Eindringen von Krankheitserregern geschützt [2]. Die Migration von Leukozyten ist essentiell für eine wirksame Immunabwehr [9, 31]. Für die Metastasierung von Tumoren ist die Migration ebenfalls von großer Bedeutung. Hierbei verlieren einzelne Zellen oder Zellverbände die Fähigkeit, an Nachbarzellen zu binden und lösen sich deshalb vom Primärtumor. Nach dem Kontaktverlust und dem Transport über Blut- oder Lymphwege kommt es zu einem Befall von gesundem Gewebe, indem die Tumorzelle die Blut- oder Lymphschranke durchwandert [7, 44]. Es wurden unterschiedliche Fortbewegungsarten bei Tumorzellen beobachtet. Zum einen gibt es die etwas schnellere Art der amöboiden Fortbewegung und zum anderen die langsamere Form der fibroblastenähnlichen Migration [7].

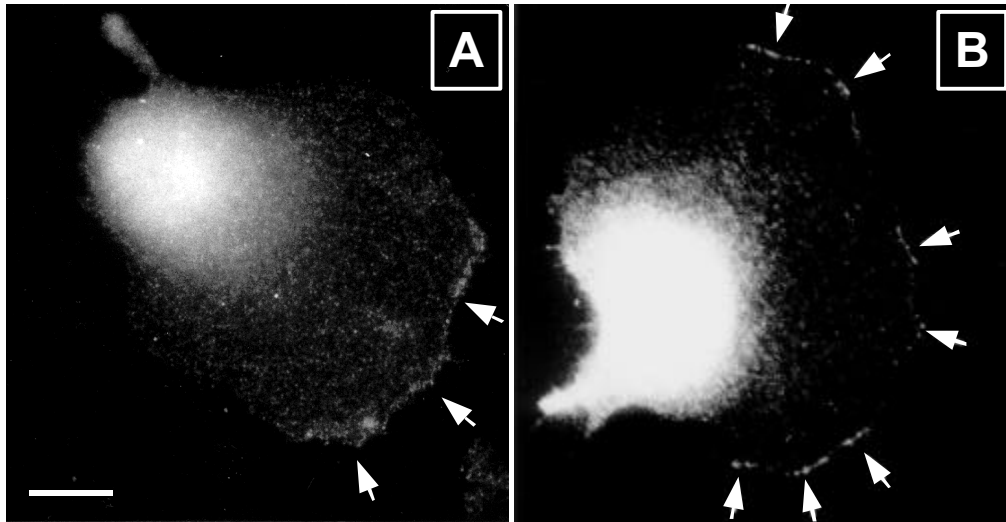
Verschiedene Modelle versuchen die Mechanismen der Migration zu beschreiben. Eine zentrale Rolle kommt dabei dem Zytoskelett zu. Zytoskelettale Umbaumechanismen, wie die Aktinpolymerisation bei der Ausbildung von Pseudopodien oder Lamellipodien am Vorderende der Zelle, sind eine elementare Voraussetzung für die Migration [3, 16]. Bei der Migration kommt es zu Endo- und Exocytosevorgängen, die die Lipidmembran der Zellen ständig umbauen. [3]. Dabei findet an der Front die Exocytose statt, um die Membran dort zu vergrößern und nach vorne zu schieben. An weiter hinten gelegenen Stellen der Zelle erfolgt die Endocytose, wobei dieser Teil verkleinert wird. Eine wichtige Rolle spielen auch Adhäsionsmoleküle (zum Beispiel Integrine), die den Kontakt zur umgebenden Matrix vermitteln und damit die Voraussetzung schaffen, die für die Fortbewegung notwendigen Kräfte auf die Umgebung zu übertragen [3, 5, 24]. Diese Kontaktstellen müssen am Vorderende geknüpft und am Hinterende gelöst werden [22].

Zusätzlich zu den beschriebenen Mechanismen ist auch die Aktivität von Ionenkanälen und –transportern von Bedeutung für die Migration [36, 38, 39]. An migrierenden Nierenepithelzellen (siehe unten: MDCK-F-Zellen), Fibroblasten, Melanomzellen und

neutrophilen Granulocyten konnte gezeigt werden, daß die Hemmung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals (IK1-Kanal) die Migrationsgeschwindigkeit deutlich herabsetzt [29, 40, 42]. Gleiches gilt auch für den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher und den  $\text{Cl}/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher. Für diese für die Migration essentiellen Ionenaustauscher wurde jeweils eine ungleiche Verteilung in den migrierenden Zellen nachgewiesen. So konnte zum Beispiel der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) an der Führungskante des Lamellipodiums in Fibroblasten nachgewiesen werden [8]. Der Natrium-Protonen-Austauscher und der Chlorid-Bikarbonat-Austauscher (AE2) konzentrieren sich in MDCK-F-Zellen ebenfalls am Vorderende des Lamellipodiums. Diese beiden Austauscher (AE2 und NHE1) transportieren Natrium und Chlorid in die Zellen. Dem Natriumchlorid-Einstrom folgt aufgrund des osmotischen Gefälles eine Wasseraufnahme in die Zelle und damit eine Volumenerhöhung [30]. Diese Beobachtungen wurden zu einem Modell zusammengefaßt, das den Beitrag von Ionenkanälen und -transportern zur Migration erklärt: AE2 und NHE1 vermitteln in erster Linie eine Volumenaufnahme am Vorderende der Zelle. Die Volumenabgabe am Hinterende der Zelle wird durch die Aktivität des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals, der vermehrt am Zelleib aktiv ist, ausgelöst [32, 37]. Diese Beispiele zeigen, daß dem polarisierten Einbau von Membranproteinen und dem Ionentransport in den migrierenden Zellen eine wichtige Bedeutung zukommt. Eine Polarisierung von Proteinen ist auch in Epithelien zu beobachten, so zum Beispiel im Nierenepithel. Ohne eine korrekte Verteilung der Proteine in der apikalen und basolateralen Membran der Epithelzellen wäre ein gerichteter transepithelialer Transport nicht möglich. Erst die Polarisierung ermöglicht die Funktion des Epithels [20].

Ziel meiner Arbeit war es, die Verteilung von Ionenkanälen in den migrierenden Zellen näher zu untersuchen. Als Modell für meine Untersuchungen wählte ich die migrierenden MDCK-F-Zellen. Abgeleitet wurde diese Zelllinie von den aus der Hundeniere stammenden Madin-Darby-Canine-Kidney-Zellen [49]. Die MDCK-F-Zellen haben, wie Tumorzellen, die Fähigkeit verloren, Nachbarzellen zu erkennen. Aus diesem Grund können sie auch kein Epithel mehr bilden, sondern wachsen und migrieren ohne Kontaktinhibition übereinander. Wie bei allen migrierenden Zellen läßt sich auch bei MDCK-F-Zellen ein Vorder- und ein Hinterende mit Lamellipodium und Zellkörper voneinander abgrenzen. Während normale Epithelzellen in apikobasolateraler Richtung polarisiert sind, ist bei migrierenden MDCK-F-Zellen eine Polarisierung in der Ebene ihrer Bewegungsrichtung zu beobachten [37]. Diese betrifft sowohl das Zytoskelett als auch die Verteilung von Membranproteinen. Die Membranproteine in den migrierenden Zellen müssen deshalb in die für sie „richtige“ Membrandomäne inseriert werden. Deshalb muß es auch verschiedene Transportwege für

Proteine in polarisierten Zellen geben, über die sie an die „richtige Stelle“ in die Zellmembran gelangen. Die „Adresse“ kann zum Beispiel durch einen bestimmten Abschnitt in der Aminosäuresequenz determiniert sein, die dem Protein einen bestimmten Transportweg vorgibt [13, 21]. Solche Polarisierungsmechanismen wurden bereits in migrierenden Zellen beobachtet [23, 24, 27]. Es wurden Membranfragmente, sogenannte „rafts“ gefunden, die im Inneren der Zelle gefertigt werden und dann durch Exocytose zu einem Teil der Zellmembran werden. „Raft“-assoziierte Proteine gelangen dabei in migrierenden Zellen an die Führungskante, wogegen ungebundene Proteine diffus in der Membran verteilt werden [18]. In vorhergehenden Studien konnte an mehreren Beispielen gezeigt werden, daß Proteine, die sich im intakten Epithel basolateral befinden, an der Führungskante des Lamellipodiums der migrierenden MDCK-F-Zellen wiederzufinden sind. Dieser Sachverhalt ließ sich für endogene Proteine wie zum Beispiel den Anionen-Austauscher (siehe Abbildung 1 A) und den Natrium-Protonen-Austauscher zeigen [14]. Auch ein exogenes Markerprotein, der spannungsabhängige K<sup>+</sup>-Kanal Kv1.4, das in die Zellen transfiziert wurde und in epithelialen MDCK-Zellen basolateral zu finden ist [19], findet sich am Vorderende der migrierenden Zellen wieder (siehe Abbildung 1 B) [28].



*Abb. 1: Verteilung „basolateraler“ Markerproteine in migrierenden MDCK-F-Zellen. Die beiden mit Hilfe der Immunocytochemie hergestellten Zellbilder zeigen die Anreicherung von endogenen (Anionenaustauscher AE2 in 1 A) und exogenen (Kv1.4 in 1 B) Markerproteinen der basolateralen Epithelzellmembran in migrierenden MDCK-F-Zellen. Sie sind an der Führungskante des Lamellipodiums angereichert (Pfeile). Das starke Fluoreszenzsignal im Bereich des Zelleibs ist auf intrazellulär lokalisierte AE2- und Kv1.4-Proteine zurückzuführen.*

*a) Anionenaustauscher AE2 (Maßstab: 20µm)[Abbildung aus Ref. 14]*

*b) Kv1.4 [Abbildung aus Ref. 28]*

Ungeklärt war dagegen, wie Transportproteine, die in Epithelzellen in die apikale Membran inseriert werden, in migrierenden Zellen verteilt sind. Ein solches apikales Protein ist zum Beispiel der Kalium-Kanal ROMK2, der in Nierenepithelzellen des Sammelrohres exprimiert wird [15, 51]. Dieser  $K^+$ -Kanal stammt aus der Kir-Familie ( $K^+$  inward rectifier) [25]. Der ATP-empfindliche ROMK2-Kanal [21] gehört zur Untergruppe Kir1.2 und ist ein Kalium-Kanal mit leicht einwärts-gleichrichtender Leitfähigkeit. Bei gleichen Triebkräften fließt mehr Kalium in die Zelle hinein, als aus der Zelle heraus [11]. Wie viele andere Kalium-Kanäle ist auch der ROMK2 durch Barium-Ionen zu hemmen. Die Aktivität und damit die Offenwahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) werden maßgeblich durch die Proteinkinase A-abhängige (PKA) Phosphorylierung des Kanalproteins bestimmt [12, 47]. Wird das Kanalprotein dephosphoryliert, nimmt seine Aktivität ab [51]. Das zeigt sich in Patch-Clamp-Experimenten oft als das sogenannte „Run-Down“-Phänomen: Mit zunehmender Dephosphorylierung



nimmt die Offenwahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) ab [17]. Dem „Run-Down“ kann durch ATP-Gabe entgegengewirkt werden [48].

Das eigentliche Ziel meiner Arbeit war es, zu klären, wie in den migrierenden MDCK-F-Zellen ein Markerprotein der apikalen Epithelzellmembran verteilt sein würde. Wenn dieses Protein anders verteilt wäre als ein basolaterales Markerprotein, so würde das auf unterschiedliche Transportwege für Proteine zur Membran der migrierenden MDCK-F-Zellen hindeuten. Um dieser Frage nachzugehen, transfizierte ich den Kalium-Kanal ROMK2, ein Markerprotein der apikalen Membran im Sammelrohrepithel der Niere [15, 51], in die MDCK-F-Zellen, die diesen Kanal nativ nicht exprimieren. [1, 6].

Den Erfolg der Transfektion des ROMK2 in MDCK-F-Zellen zeigte ich zunächst mit Versuchen mit der Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription auf mRNA-Ebene. Diese Versuche konnten lediglich klären, ob die Kanal-RNA in den Zellen vorhanden war. Dadurch konnte noch keine Aussage darüber gemacht werden, ob das Protein exprimiert und in die Zellmembran eingebaut wird. Erst durch die Patch-Clamp-Versuche und die Migrationsexperimente konnte der eindeutige Beweis erbracht werden, daß funktionelle ROMK2-Kanalproteine in die Zellmembran der MDCK-F-Zellen eingebaut worden sind. Sie legten die Grundlage, um mittels Immunfluoreszenz schließlich die subzelluläre Verteilung des ROMK2 in den migrierenden MDCK-F-Zellen zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere darauf geachtet werden, ob sich das ROMK2-Protein ebenfalls an der Führungskante des Lamellipodiums der MDCK-F-Zellen anreichern würde oder nicht. Würden diese Versuche eine andere Lokalisation ergeben als für basolaterale Markerproteine, so würde das dafür sprechen, daß es in migrierenden Zellen ebenso wie auch in normalen Epithelzellen unterschiedliche Wege zum Transport von Proteinen vom endoplasmatischen Retikulum zur Zellmembran geben würde.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

Die Experimente wurden mit MDCK-F-Zellen [26, 49] durchgeführt, die ein etabliertes Modell zur Untersuchung der Funktion und Verteilung von Ionenkanälen in migrierenden Zellen sind [32-41].

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in beschichteten Petrischalen (Falcon, Wiesbaden) in einem Brutschrank bei gleichbleibenden Bedingungen (37 °C, wasserdampfgesättigte, 5%ige CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) kultiviert. Als Kulturmedium diente HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-gepuffertes Minimum Essential Medium (MEM; Biochrom KG, Berlin) mit einem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (Biochrom KG, Berlin). Die transfizierten Zellen wurden immer unter Zugabe von 600µg/ml Geneticin (Gibco/BRL) kultiviert, um einen Selektionsdruck zu erreichen. Hatten sich die Zellen nach 3 bis 4 Tagen so oft geteilt, daß circa 75% des Bodens der Petrischalen bedeckt waren, so mußten sie unter sterilen Bedingungen (Lamin Air Flow BSB6 Gelair, Meckenheim) abgelöst und ein Teil von ihnen in einer neuen Kulturschale angesät werden. Dieser Vorgang wird als „Splitten“ bezeichnet.

Dazu wurde zuerst das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit circa 10 ml einer EDTA-Lösung überspült, um extrazelluläres Ca<sup>2+</sup> zu binden. Als nach circa 10 Sekunden dieser Vorgang abgeschlossen war, wurde die EDTA-Lösung abgesaugt und circa 1 ml einer Trypsin-Lösung in die Petrischale gegeben. Das Trypsin bewirkte ein Loslösen der Zellen vom Schalenboden, das durch Schütteln und Klopfen unterstützt wurde. Nachdem unter dem Mikroskop kontrolliert wurde, daß alle Zellen abgelöst waren, wurden 10 ml des Kulturmediums hinzugegeben, das die Wirkung des Trypsins aufhob. 1 ml dieser Zell-Suspension wurden anschliessend in eine mit 10 ml Kulturmedium befüllte Petrischale pipettiert und diese wiederum in den Brutschrank zur Inkubation gegeben.

Für die Migrationsversuche wurden die Zellen auf speziellen Deckgläsern (siehe 2.8) angesät. Um die Zellen auf diesen Deckgläsern zu kultivieren, mußten sie zuvor mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (0,1g/l; Serva, Heidelberg) beschichtet werden. Dazu füllte man das Deckglas mit 1 ml der Lösung und inkubierte sie für circa 3 Minuten bei Raumtemperatur. Anschliessend wurde die Poly-L-Lysin-Lösung abgesaugt und die Deckgläser mit Kulturmedium gespült. Zum Ansäen wurden ein paar Tropfen der Zell-Medium-Suspension auf die mit 1 ml MEM befüllten Deckgläser gegeben und diese im Brutschrank für 6 bis 24

Stunden inkubiert. Für die Patch-Clamp-Experimente wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern ohne den Polyethylenring angesät.

Für die Immuncytochemie wurden vorgefertigte Objektträger (DUNN, Asbach) verwendet. Nach dem Einbringen der autoklavierten Objektträger in unbeschichtete Kulturschalen erfolgte wieder das Beschichten mit Poly-L-Lysin. Danach konnte den Schalen das Kulturmedium und 2 ml der Zell-Medium-Suspension zugegeben werden.

Für die Patch-Clamp-Versuche und die Immunfluoreszenz wurde zur Anregung der ROMK2-Expression dem Kulturmedium Natriumbutyrat (10mmol/l) zugegeben.

## **2.2 Stabile Transfektion**

Der in einen eukaryontischen Expressionsvektor (pcDNA3) einklonierte ROMK2 (Genbank Accession-Nr.: s78154/s78153s2, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Xu, Nashville, U.S.A.) wurde mit Lipofektin Pfx 4 (Invitrogen, San Diego) nach Herstellerangaben in die MDCK-F-Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurde der Vektor ohne die ROMK2-cDNA transfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurden für beide Ansätze jeweils 11 µg DNA und 33 µg Lipofektin zusammen für 15 Minuten inkubiert. Das Gemisch konnte den MDCK-F-Zellen zugegeben werden, wenn nach dem „Splitten“ circa 24h vergangen waren und das Kulturmedium gegen MEM ohne fetalem Kälberserum ausgetauscht worden war. Ein Mediumwechsel mit einem Antibiotikumzusatz von Penicillin/Streptomycin erfolgte nach circa 5 Stunden, um einem Bakterienbefall der Kultur vorzubeugen. Da sich in den Plasmiden das Resistenzgen für Geneticin befand, wurden die Zellen ab dem nächsten Tag nur noch mit einem Geneticin-Zusatz (600µg/ml) kultiviert, um die Selektion transfizierter Zellklone zu ermöglichen. In Anwesenheit von Geneticin können nur solche Zellen überleben, die das Resistenzgen tragen, die also transfiziert sind.

Der Einbau des K<sup>+</sup>-Kanals ROMK2 in die Membran der transfizierten Zellen läßt erwarten, daß deren Membranpotential massiv hyperpolarisiert. Um diese Hyperpolarisierung abzuschwächen, wurden die transfizierten Zellen zu Beginn mit einem Medium mit erhöhter K<sup>+</sup>-Konzentration (20mmol/l) kultiviert. Durch diese Behandlung sollte vermieden werden, daß das Membranpotential durch den permanent aktiven ROMK2-Kanal auf zu negative Werte „geklemmt“ wird.

### **2.3 RNA-Isolation**

Für die folgenden Experimente war es erforderlich, die RNA aus den Zellen zu isolieren. Die RNA ist ein sehr labiles Molekül, das sehr einfach durch die nahezu ubiquitär vorkommenden RNAasen zerstört werden kann. Deshalb mußten besondere Maßnahmen getroffen werden, um diesen unerwünschten Effekten entgegenzutreten: Bei allen Arbeiten wurden neben der üblichen Laborkleidung auch Latexhandschuhe getragen. Sämtliche Reagenzien, die mit der RNA in Berührung kamen, mußten für diesen speziellen Zweck geeignet sein, also RNase frei sein. Alle Glasgefäße und Dosierspatel wurden vor Gebrauch mehrere Stunden bei 180° C „ausgebacken“, um das Risiko einer RNase-Kontamination zu minimieren.

Auf große, mit Zellen bewachsene Petrischalen wurden nach Absaugen des Mediums 2 ml Guanidiniumisothiocyanat-Lösung gegeben, um dadurch die Zellen zu lysieren. Nach Aufnahme der GITC-Lösung wurde 0,1 ml 2mol/l Na-Acetat (pH 4), 1ml Aqua-Phenol und 0,2 ml Chloroform, zugegeben. Nach Inkubation auf Eis wurde 30 Minuten bei 4° C und 10 000g zentrifugiert, wodurch eine Phasentrennung mit Interbande entstand. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA und wurde abpipettiert. Es folgte eine Fällung mit Isopropylalkohol (-20° C und gleichem Volumen, wie die RNA-Lösung), eine einstündige Inkubation bei -20° C und abermals eine Zentrifugation bei 10 000g und 4° C. Der Überstand wurde danach dekantiert und das zurückbleibende RNA-Pellet in 300µl Guanidinium-Lösung resuspendiert. Danach wurde die RNA mit 1/10 Volumen 3mol/l Na-Acetat (pH 5,2) und 1 Volumen Isopropylalkohol (-20° C) erneut gefällt und 30 Minuten bei -20° C inkubiert. Nach wiederholtem Abzentrifugieren wurde das Pellet mit 85% Ethanol gewaschen und anschliessend in einem Wärmeschrank bei 40° C getrocknet, um es dann in 100µl Wasser aufnehmen zu können. 5µl dieser RNA-Lösung wurden für die Konzentrationsbestimmung mit einem Photometer (SPEKOL UV-VIS, Fa. ZEISS) abgezweigt. Dabei wurde die optische Dichte bei Wellenlängen von 260 und 280 nm bestimmt. Mit der Formel

$$x = 40 * OD_{260} * \text{Verdünnung}$$

konnte die Konzentration der Proben in µg/ml errechnet werden. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei 40 µg/ml RNA. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  konnte herangezogen werden, um eine Aussage über den Reinheitsgrad der Proben zu machen. Dabei ließen Werte zwischen 1,8 und 2,0 auf sehr saubere Isolationsproben schliessen.

Diese Isolation erfolgte bei allen acht mit dem ROMK2 transfizierten Zellklonen und untransfizierten MDCK-F-Zellen.

Mit einem denaturierenden RNA-Agarosegel (Gelbeschreibung siehe unten) wurde die Qualität der extrahierten RNA überprüft.

#### **2.4 cDNA-Synthese**

Um PCR-Versuche durchführen zu können, mußte die aus den Zellen gewonnene RNA zunächst zu cDNA revers transkribiert werden. Dazu wurden 11 µl einer RNA-Lösung mit einer Konzentration von 0,5 µg/µl zunächst für 10 Minuten auf 65° C erwärmt und dann auf Eis abgekühlt. Die danach zugegebenen 8µl Puffergemisch enthielten 4 µl 5xPuffer, 2µl 0,1 M DTT, 1µl 10mmol/l dNTP und 1µl 0,5 mg/ml pd(T). Die cDNA erhält man nach Zugabe des Reverse-Transkriptase-Enzyms SUPERSCRIPT (Gibco BRL) und anschließender Inkubation für eine Stunde bei 37°C.

Um später bei der PCR auch eine Negativkontrolle zu haben, wurde ein sogenannter RT<sup>-</sup> -Ansatz hergestellt, der auf dieselbe Art und Weise behandelt wurde, wie der RT<sup>+</sup>-Ansatz, nur ohne Zugabe der reversen Transkriptase.

#### **2.5 Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR)**

Zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion des ROMK2-Kanalproteins in die MDCK-F-Zellen wurden RT-PCR-Versuche mit einem Thermocycler (Progene, Techne, Cambridge, U.K.) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz setzte sich aus 3 µl cDNA, 3µl 10x Puffer, 6µl Q Solution, 1,2 µl dNTP (10 mmol/l), jeweils 0,6 µl der zwei ROMK2-spezifischen Primer (20pmol/µl), 0,3µl *Taq* Polymerase (5 u/µl) (Qiagen, Hilden) und 15,3µl H<sub>2</sub>O zusammen. Die Überschichtung der Ansätze mit 40µl leichtem Mineralöl (Sigma-Aldrich, Steinheim), sollte deren Verdampfen bei hohen Temperaturen verhindern. Mit dem sense-Primer (MWG Biotech, Ebersberg) (5'-GGCATCCAAACTCTTGAATC-3', ab Position 69) und dem antisense-Primer (5'-TTTGGGTCTAGAGATCTTGGC-3', ab Position 692) sollte ein 623 Basenpaare großes Fragment aus der cDNA der ROMK2-transfizierten Zellen amplifiziert werden. Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 94° C für 5 Minuten, wurde bei jedem der 30 Zyklen das Material verdoppelt. Das ROMK2-Fragment wurde mit folgendem Temperaturprofil amplifiziert: ein Zyklus bestand aus der Abfolge von 1 Minute Denaturierung der DNA bei 94° C, 1 Minute Anlagerung der Primer bei 50°C und 1 Minute und 15 Sekunden Verlängerung der Primer. Es wurde die cDNA aller 8 Zellklone, die nach der Transfektion isoliert wurden, überprüft. Als Kontrollen dienten die sogenannten RT<sup>-</sup> -

Ansätze und die cDNA der nativen MDCK-F-Zellen, die nicht mit dem ROMK2 transfiziert waren.

## **2.6 Gelelektrophorese**

Die PCR-Produkte wurden durch Agarose- oder Polyacrylamidgelelektrophorese der Größe nach getrennt. Das 1%ige Agarosegel setzte sich zusammen aus 0,6g Agarosepulver (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 60 ml 0,5x TBE-Puffer. Um die Agarose aufzulösen, wurde das Gemisch in einem Mikrowellenofen aufgeköcht und anschließend zur Aushärtung in einer Gelkammer in einen Kühlschrank gestellt. Um das denaturierende RNA-Gel zu erhalten, mischte man zu 0,6g Agarosepulver und 51 ml H<sub>2</sub>O 6 ml 10x MOPS (3-(N-Morpholin)-Propansulfonsäure) und 3 ml Formaldehyd.

Zur Herstellung des Polyacrylamidgels (PAGE) mischte man 11 ml Wasser mit 2,25 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (Bio-Rad, Hercules, Californien), 1,5 ml 10x TBE-Puffer, 150µl Ammoniumpersulfat (10% w/v) und 15µl TEMED (Amresco, Solon, Ohio) und pipettierte das Gemisch in die PAGE-Gelkammer (Peqlab, Erlangen).

Bevor die PCR-Ansätze in die Geltaschen pipettiert werden konnten, wurden sie mit einem Ladepuffer (Peqlab, Erlangen) vermischt, um die Dichte der Probe zu erhöhen. Nach Einbringen der Proben in die Geltaschen sackten diese auf den Boden des jeweiligen Kompartiments und konnten sich nicht mehr im Laufpuffer verflüchtigen. Um die Größe der aufgetragenen DNA-Fragmente ermitteln zu können, wurde auf jedes Gel zusätzlich ein Längenstandard (Marker X, 0,07-12,2 kb, Boehringer, Mannheim) aufgetragen. Die Größenfraktionierung der eingebrachten DNA-Proben erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 80 mV bei Agarosegelen beziehungsweise 120 mV bei Polyacrylamidgelen. Nach 1 – 1,5 Stunden war üblicherweise eine ausreichende Trennung erreicht und die Gele wurden mit 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) in einem Wasserbad gefärbt. Ethidiumbromid lagert sich an die DNA an, so daß diese mit einem UV-Transilluminator (Biometra, Göttingen) als fluoreszierende Bande erkannt werden kann. Bevor das Gel ausgewertet werden konnte, mußte es in einem Wasserbad wieder entfärbt werden, um eine Verbesserung der Kontrastierung zu erreichen.

<b>Substanzen</b>	<b>10x PBS-Puffer (in mmol/l)</b>	<b>10x TBE-Puffer (in mmol/l)</b>
NaCl	1370	-
KCl	27	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	43	-
C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	-	890
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	-	890
0,5M EDTA	-	20

*Tab. 1: Zusammensetzung von Pufferlösungen.*

## **2.7 Umklonierung des PCR-Produkts**

Um sicher zu sein, daß es sich bei genanntem Amplifikat tatsächlich um ein Fragment des ROMK2 handelte, wurde es zur Sequenzierung an ein Fremdlabor geschickt (MWG Biotech, Ebersberg). Dazu mußte es zunächst in einen prokaryotischen Expressionsvektor (pCR 2.1) einkloniert werden. Dies geschah mit dem „Original TA Cloning Kit“ (Invitrogen, Carlsbad, Californien). Das Prinzip beruht darauf, daß die Taq-Polymerase an die 3'-Enden der beiden DNA-Stränge Adeninreste anhängt, die komplementär zu den 3'-Thymidinresten des linearisierten Vektors sind. Zuerst mußte das PCR-Produkt aus dem Agarosegel mit einer Rasierklinge ausgeschnitten werden. Die in diesem Agaroseblock befindliche DNA wurde mit Hilfe von Membranextraktionssäulen (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden) extrahiert. Von dieser DNA-Lösung wurden 6 µl mit 2 µl des Vektors pCR2.1, 1 µl 10x Puffer und 1 µl (4 units) T4 DNA Ligase (Invitrogen) vermischt und 16 h bei 14° C im Thermocycler inkubiert. Das Ligationsprodukt wurde anschliessend in einen E. coli-Bakterien-Stamm transformiert (TOP10F', Invitrogen), indem 2 µl der Ligationslösung zu den Bakterien pipettiert wurden. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis, eine Erwärmung im Wasserbad auf 42° C für exakt 30 Sekunden, die Zugabe von 250 µl S.O.C-Medium und eine Inkubation im Thermoschüttler (Heidolph, Kehlheim) für eine Stunde bei 37° C. Beim Ausplattieren, dem gleichmässigen Verteilen der transformierten Bakterien auf ampicillinhaltigen (50 µg/ml) Luria-Bertani-(LB)-Agar-Platten, wurden 8 µl X-Gal (5-bromo-

4-chloro-3-indolyl-D-Galactosid; 40 mg/ml) und 40 µl IPTG (Isopropyl-D-thiogalaktosidase; 100 mmol/l) mitverteilt. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37° C inkubiert. IPTG und X-Gal bewirken eine Farbveränderung durch „Anschalten“ des „lac“-Promotors, wenn ein Vektor ohne Insert transfiziert wurde. Bakterienkolonien mit dem Vektor ohne Insert erschienen blau. War der Vektor mit Insert transfiziert, erschienen diese weiß. Vermeintlich positiv-transfizierte Bakterienkolonien, die an ihrer weißen Farbe zu erkennen waren, konnten so nach der Inkubation von den Platten „gepickt“ und in LB-Medium suspendiert werden. Um die erfolgreiche Transformation zu zeigen, wurde von dieser Lösung nochmals eine PCR nach oben beschriebenem Muster durchgeführt. Von den „positiven“ Bakterienkolonien wurden jeweils Übernachtskulturen im Thermoschüttler gezogen, um am darauffolgenden Tag die Plasmid-DNA isolieren zu können. Die DNA-Isolation erfolgte mit dem QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden). Mit der so gewonnenen Plasmid-DNA führte ich zudem einen Restriktionsverdau durch, mit dem nachgewiesen werden sollte, daß sich das PCR-Amplifikat im Vektor befand. 5 µl der DNA-Lösung (circa 1 µg DNA) wurden mit 0,7 µl Eco RI (entspricht 7 units), 2 µl 10X Puffer, 2µl 10X BSA und 10,3 µl H<sub>2</sub>O vermischt und für 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschliessend wurde der Reaktionsansatz wiederum durch ein Agarosegel getrennt.

Nach Fällung (Natriumacetat, Waschschrte in Ethanol) und Trocknung der verbleibenden DNA konnte diese dem Labor (MWG Biotech, Ebersberg) in einem Eppendorf-Cap zur Sequenzierung zugesendet werden.

<b>Substanzen</b>	<b>LB-Medium (/l)</b>	<b>LB-Agar (/l)</b>	<b>S.O.C.-Medium (/l)</b>
NaCl	5 g	5 g	10mmol
Trypton	10 g	10g	20 g
<b>Hefe-Extrakt</b>	5 g	5 g	5g
<b>1 N NaOH</b>	1 ml	1 ml	-
Agar	-	15 g	-
KCl	-	-	2,5 mmol
MgSO <sub>4</sub>	-	-	10 mmol
MgCl <sub>2</sub>	-	-	10 mmol
Glukose	-	-	20 mmol
Ampicillin	100 mg	50 mg	-

*Tab. 2: Zusammensetzung von Nährmedien für die Bakterienkultur.*

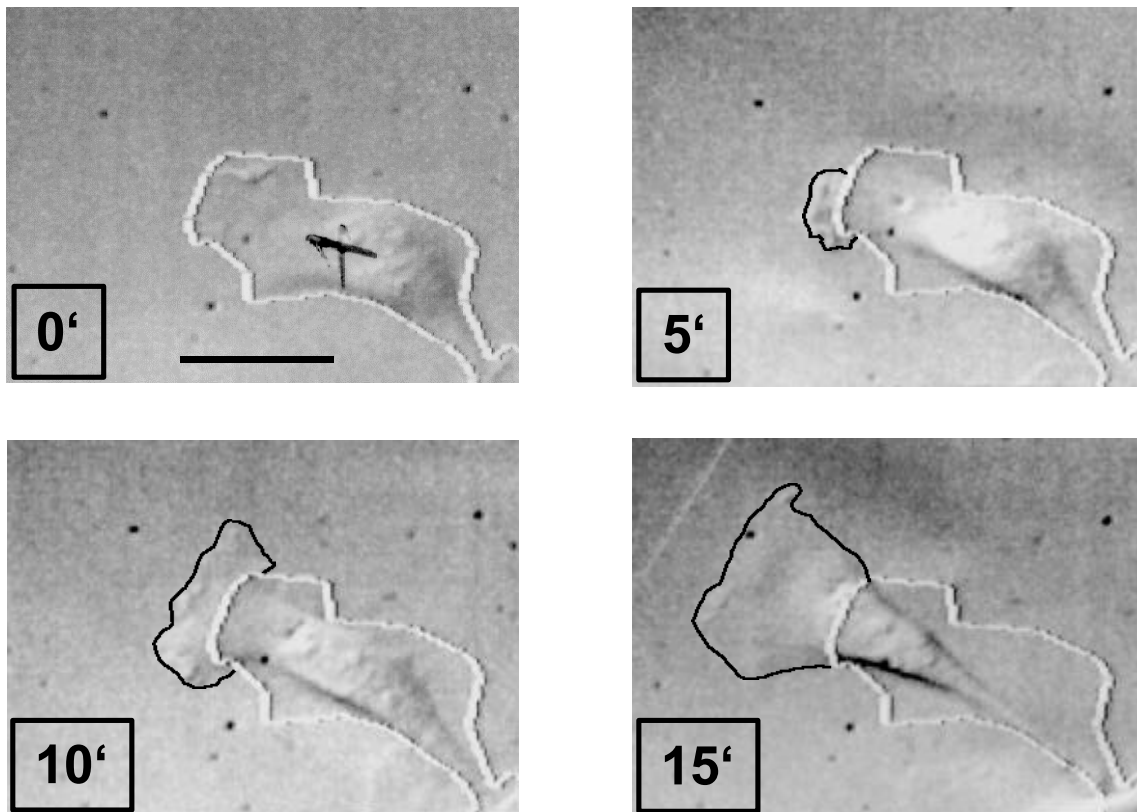


## **2.8 Migrationsexperimente**

Mit diesen Versuchen sollte geklärt werden, ob sich der Einbau des ROMK2-Kanals in die MDCK-F-Zellen auf die Migration der Zellen auswirken würde. Die Versuche wurden an einem inversen Mikroskop mit Differentialinterferenzkontrast (Zeiss IM 35, Oberkochen) bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt. Während der Experimente wurden die Zellen kontinuierlich mit HEPES-gepufferter Ringerlösung superfundiert. Die Zellen befanden sich auf einem Deckglas, auf das ein Polyethylenring aufgeklebt war. Dieser ermöglichte, daß sich ständig ein konstanter Spiegel an Ringerlösung auf dem Deckglas befand. Dieser Spiegel konnte durch Einstellen der Zulauf- und Absaugpipette, die zu beiden Seiten des Mikroskops montiert waren, reguliert werden. Die Superfusionslösung wurde vor dem Austritt aus der Zulaufpipette in einem Wasserbad auf 37° C erwärmt.

Das Mikroskop war an eine Videoanlage (Videokamera Panasonic TV Camera; Matsushita Communication Industrial Co. Ltd., Japan; Videorekorder HR-D430EG, JVC, Deutschland) mit einem Bildverarbeitungsprogramm (JAVA, Jandel Scientific, Corte Madera, USA) angeschlossen. Die Migration ließ sich damit am Bildschirm verfolgen und über ein Standbild mit einer individuellen Zellmarkierung, die zu Beginn eines jeden Experiments festgelegt wurde (siehe Abbildung 2), dokumentieren. Die Auswertung erfolgte anhand von Videoausdrucken (Video Graphic Printer UP 850, Sony, Japan). Als Maß für die Migrationsgeschwindigkeit einzelner Zellen diente die Strecke, welche die Vorderkante des Lamellipodiums pro Zeitintervall zurücklegte. Diese Strecke konnte direkt aus den Videoausdrucken ermittelt werden. Es mußte dabei gewährleistet sein, daß sich während der Versuchsphase sowohl das Lamellipodium, als auch der Zellkern in dieselbe Richtung bewegen. Damit war sichergestellt, daß es sich nicht nur um ein Abflachen der Zellen („spreading“) handelte. Zellen, die unter Kontrollbedingungen eine Geschwindigkeit von 0,4µm/min nicht erreichten, wurden nicht gewertet.

Mit dieser Methode untersuchte ich die Migration von ROMK2- und Mock-transfizierten Zellen.

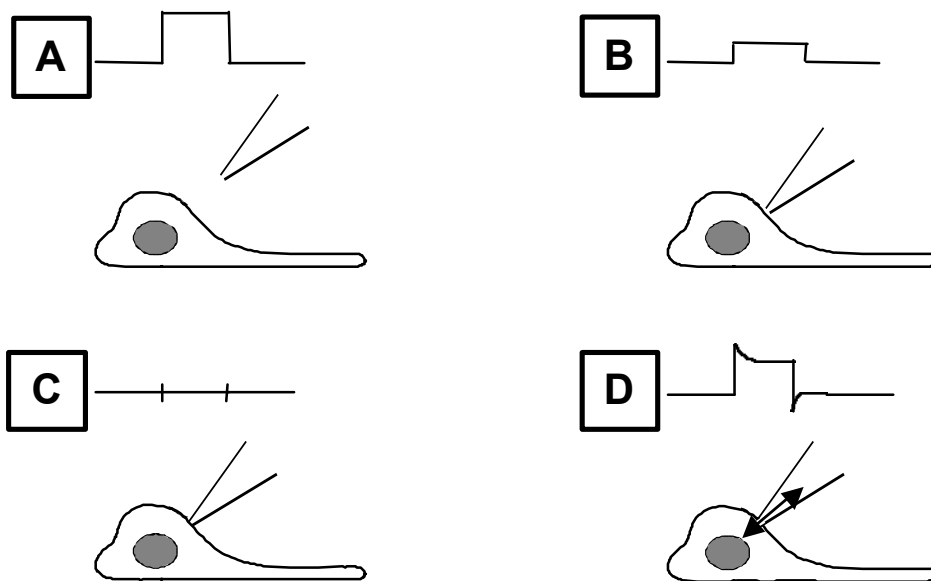


*Abb. 2: Migration einer MDCK-F-Zelle. Diese Abfolge von Bildern dokumentiert die Migration einer MDCK-F-Zelle. In diesem Experiment wurde alle 5 Minuten ein Videoausdruck festgehalten. Anhand der Umrandung um die Zelle (weiß), die zu Beginn des Experiments gelegt wurde, konnte anschliessend zu jedem Zeitpunkt die zurückgelegte Strecke ermittelt werden. In diesem Fall migriert die Zelle mit einer Geschwindigkeit von circa  $1 \mu\text{m}/\text{min}$  von rechts unten im Bild nach links oben (Balken entspricht  $20 \mu\text{m}$ ).*

## **2.9 Patch-Clamp-Experimente**

Die Patch-Clamp-Experimente wurden in der sogenannten Ganzzellkonfiguration durchgeführt [10]. Mit dieser Technik war es möglich, Ströme an einzelnen Zellen zu messen. Dazu war es

nötig, zunächst eine dichte Verbindung, die „Seal“ genannt wird, zwischen Zelle und Pipette herzustellen, wie in Abbildung 3 ersichtlich wird. Die Pipette wurde dabei unter mikroskopischer Kontrolle vorsichtig auf die Zelle gefahren, ohne sie dabei zu verletzen. Dann wurde durch Saugen an einem Schlauchsystem, das mit der Pipette verbunden war, ein Unterdruck erzeugt. Die Ganzzellkonfiguration wurde dann dadurch erreicht, daß der Unterdruck die Membran im Bereich der Kontaktstelle Zelle-Pipette aufbricht und eine Verbindung zwischen Zelle und Pipette entstand.



*Abb 3.: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zum Erreichen eines ‚Seals‘. (Über den Zellschemata sind die Anzeigen im Oszilloskop aufgezeichnet.)*

- A. Die Pipette ist noch weit von der Zelle entfernt. Es fließt ein großer Strom.*
- B. Die Pipette nähert sich der Zelle. Der Strom verkleinert sich aufgrund des höher werdenden Widerstands.*
- C. Das ‚Seal‘ ist gebildet. Es fließt kein Strom mehr.*
- D. Durch Anlegen eines Unterdrucks wird die Zellmembran aufgebrochen. Die Zelle ist nun direkt mit dem Verstärker verbunden. Man kann so den über die gesamte Zellmembran fließenden Strom messen.*

Innerhalb kurzer Zeit tauschte sich die exakt definierte Pipettenlösung mit der intrazellulären Flüssigkeit aus. Nun konnte über die Verstärker, der einerseits mit der Pipette und andererseits mit der Badlösung in Verbindung stand, der Strom gemessen werden, der durch alle Ionenkanäle der Zellmembran floß.

Mit diesen Experimenten sollte gezeigt werden, daß sich funktionelle ROMK2-Kanalproteine in der Membran der transfizierten Zellen befanden. Die Versuche wurden mit ROMK2-transfizierten Zellen und mit Mock-transfizierten Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden in ähnlicher Weise, wie bei den Migrationsexperimenten behandelt und kontinuierlich mit 37° C warmer Ringer-Lösung überspült. Die Blockade des ROMK2-Kanals wurde durch Zugabe des Kalium-Kanal-Blockers Bariumchlorid (5 mmol/l) erreicht. Zusätzlich wurden auch Ringerlösungen verwendet, die 140 mmol/l KCl enthielten. Die Pipettenlösung war nominell Ca<sup>2+</sup>-frei, um eine Aktivierung der endogenen, Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Kalium-Kanäle zu vermeiden. Die Pipetten (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt) wurden mit einem Puller (FMI GmbH, Pohlheim) in einem zweistufigen Prozess gezogen. Anschliessend wurden sie „poliert“, das heißt, sehr nahe an einen glühenden Wolfram-Draht geführt, um sie zu vergüten. Die Pipetten wurden durch eine dünne Kunststoffkanüle mit der Pipettenlösung gefüllt. Um dem „Run-Down“-Effekt des ROMK2-Kanals entgegenzuwirken, wurde die Pipettenlösung mit 0,1 mmol/l ATP versetzt [48]. Aufgrund der Instabilität des ATP mußte die Pipettenlösung stets auf Eis aufbewahrt werden. Die Pipetten waren an einem Mikromanipulator (ZEISS, Oberkochen) befestigt, mit dem es über eine elektronische Joystick-Steuerung (ZEISS, Oberkochen) möglich war, sie möglichst nahe an die Zellen heranzubringen. Verbunden waren die Pipetten mit einem Patch-Clamp-Verstärker (L/M-EPC7, List Electronic, Darmstadt). Dieser Verstärker depolarisierte die Zellen alle 2 Sekunden für 400 ms, ausgehend bei einem Haltepotential von -80 mV, in 10 mV – Schritten bis +60 mV (siehe Abbildung 4). Die Ströme wurden auf einem EDV-System mit PCLAMP Software V 5.5.1 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) digitalisiert und analysiert. Die Kurvenverläufe wurden mit einem Thermodrucker aufgezeichnet (EasyGraf TA 240, GOULD, Valley View, Ohio, USA; siehe Abbildung 8).

Die Ergebnisse wurden, um sie übersichtlicher darstellen zu können, normiert. Dazu wurde der jeweilige Maximalstrom einer Messreihe gleich 1 gesetzt und die übrigen Ströme im Verhältnis dazu umgerechnet.

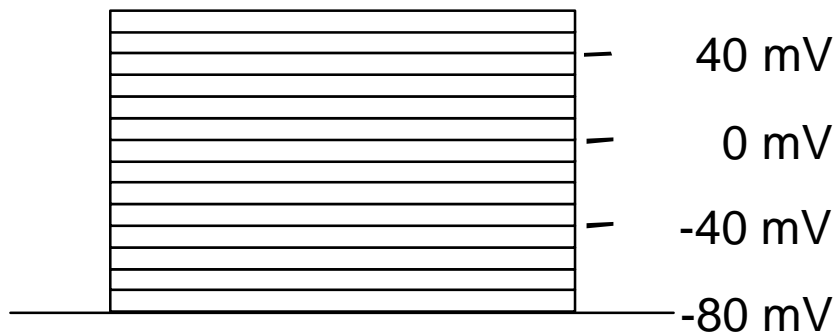


Abb. 4: **Pulsprotokoll für die Patch-Clamp-Experimente.** Ausgehend von  $-80\text{ mV}$  wurde das Membranpotential alle 2 Sekunden für 400 ms auf einen jeweils  $10\text{ mV}$  höheren Wert bis hin zu  $60\text{ mV}$  geklemmt.

Substanzen	Ringerlösung (in mmol/l)	Hoch-Kalium-Ringerlösung (in mmol/l)	Pipettenlösung g
NaCl	122,5	-	-
KCl	5,4	140	140
MgCl <sub>2</sub>	0,8	0,8	1
CaCl <sub>2</sub>	1,2	1,2	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	1	1	-
Glukose	5,5	5,5	-
HEPES	10	10	10
EGTA	-	-	1
PH	7,4	7,4	7,4

Tab. 3: **Zusammensetzung verschiedener Ringerlösungen für Migrations- und Patch-Clamp-Experimente.** Die mit HEPES gepufferten Lösungen wurden mit  $1\text{ mol/l}$  NaOH-Lösung auf pH 7,4 titriert.

## **2.10 Immunfluoreszenz-Versuche**

Die Lokalisation der ROMK2-Proteine in der Zellmembran der transfizierten MDCK-F-Zellen sollte mit Hilfe der indirekten Immuncytochemie untersucht werden. Der polyklonale, affinitätsgereinigte Antikörper, war durch Immunisierung von Kaninchen gegen das gesammte Kanalprotein hergestellt worden (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jason Xu, Nashville, U.S.A.).

Zuerst wurden die auf den Objektträgern angesäten Zellen mit PBS-Puffer in den Kulturschalen kurze Zeit gewaschen, bevor sie 30 Minuten in 4%igem Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert wurden. Dieser und die weiteren Schritte erfolgten in Glasküvetten, in der die Objektträger stehend gelagert werden konnten. Es folgte wiederum ein Waschschrift mit PBS, bevor die Zellen mit 0,1 % Triton in PBS permeabilisiert wurden. Die Zellmembranen wurden damit durchlässig gemacht, so dass die primären Antikörper später bei der Inkubation in die Zellen gelangen konnten. Nach zwei weiteren PBS-Wasch-Schritten à 5 Minuten wurde 30 Minuten mit Ziegennormalserum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) (10% in 10 mmol/l Phosphat, 150 mmol/l NaCl, bei pH 7,8) bei Raumtemperatur „geblockt“, um ein unspezifisches Anlagern des 1. Antikörpers zu verhindern. Hierzu wurde das Serum mit einer Pipette direkt auf die Felder auf dem Objektträger aufgetragen. Während dieser Zeit wurden die Objektträger in einer großen, befeuchteten Petrischale, die als eine Art „Humidor“ funktionierte, gelagert, um ein Austrocknen der bedeckten Felder zu verhindern. Danach wurde der 1. Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 in 10% Ziegennormalserum auf die Zellfelder gegeben und wiederum in der befeuchteten Petrischale 2-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um den 1. Antikörper zu entfernen, folgten zwei Waschschrift mit einer PBS-Lösung, die zusätzlich 28 g/l NaCl enthielt, und zwei weitere Waschschrift mit normalem PBS. Der zweite Antikörper (Anti-Kaninchen IgG cy3, DIANOVA, Hamburg), der sich spezifisch an den ersten anlagern sollte und der nach Anregung mit gefiltertem, monochromatischem Licht der Wellenlänge 520 nm fluoreszierte, wurde danach für eine Stunde bei Raumtemperatur, in einer Verdünnung von 1:100 auf die Zellfelder des Objektträgers gegeben. Nach weiteren Waschschrift mit Natriumchlorid-angereichertem PBS und normalem PBS erfolgte das „Eindecken“ der Objektträger mit ein paar Tropfen Eindeckmedium (VECTASHIELD, Vector Lab., Burlingame, Californien) und einem Deckglas. Die angefärbten Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (IM 35, Zeiss, Oberkochen) betrachtet. Der Fluoreszenzfarbstoff am zweiten Antikörper wurde mit Hilfe eines entsprechenden Filters (IM 35, Zeiss, Oberkochen), der am Mikroskop montiert war,

mit der Wellenlänge  $\lambda = 520 \text{ nm}$  angeregt. Das Ergebnis wurde durch Aufnahmen mit einer Spiegelreflexkamera (CONTAX, Japan), die ebenfalls am Mikroskop montiert war, dokumentiert.

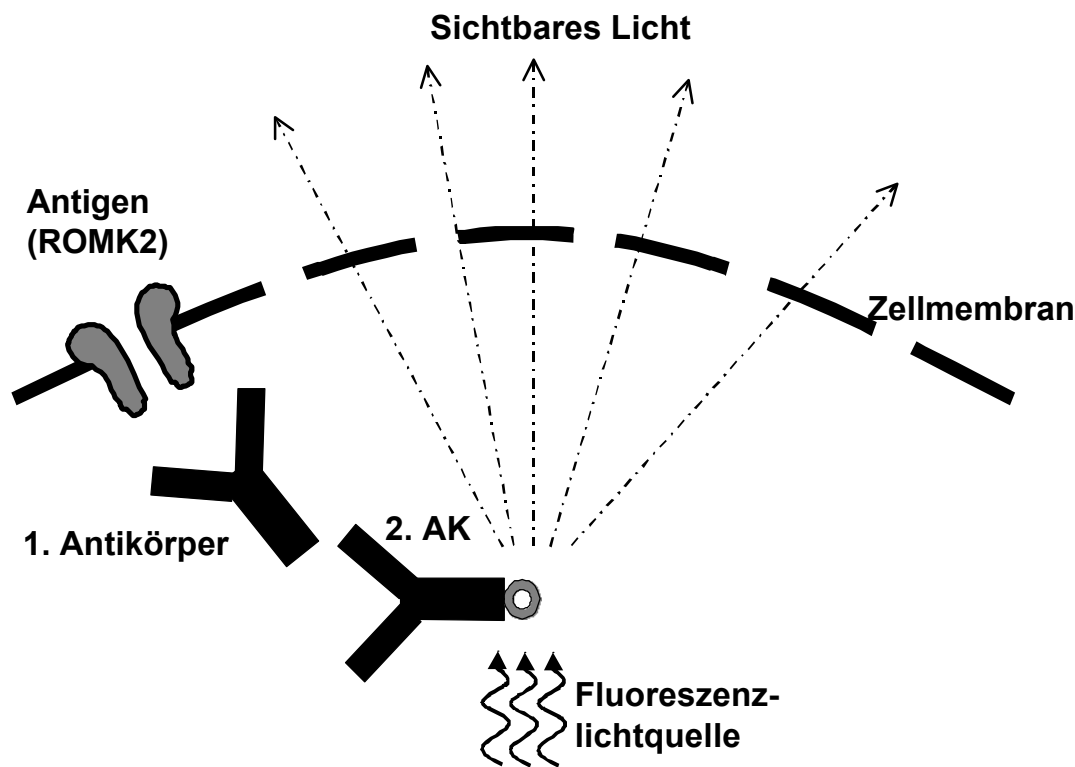


Abb. 5: Schemazeichnung der Funktionsweise der indirekten Immunfluoreszenz. Der erste Antikörper bindet an das Kanalprotein. Der zweite Antikörper ist gegen den ersten gerichtet. Der fluoreszierende Farbstoff cy3 ist an den zweiten Antikörper gekoppelt und fluoresziert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 520 \text{ nm}$ .

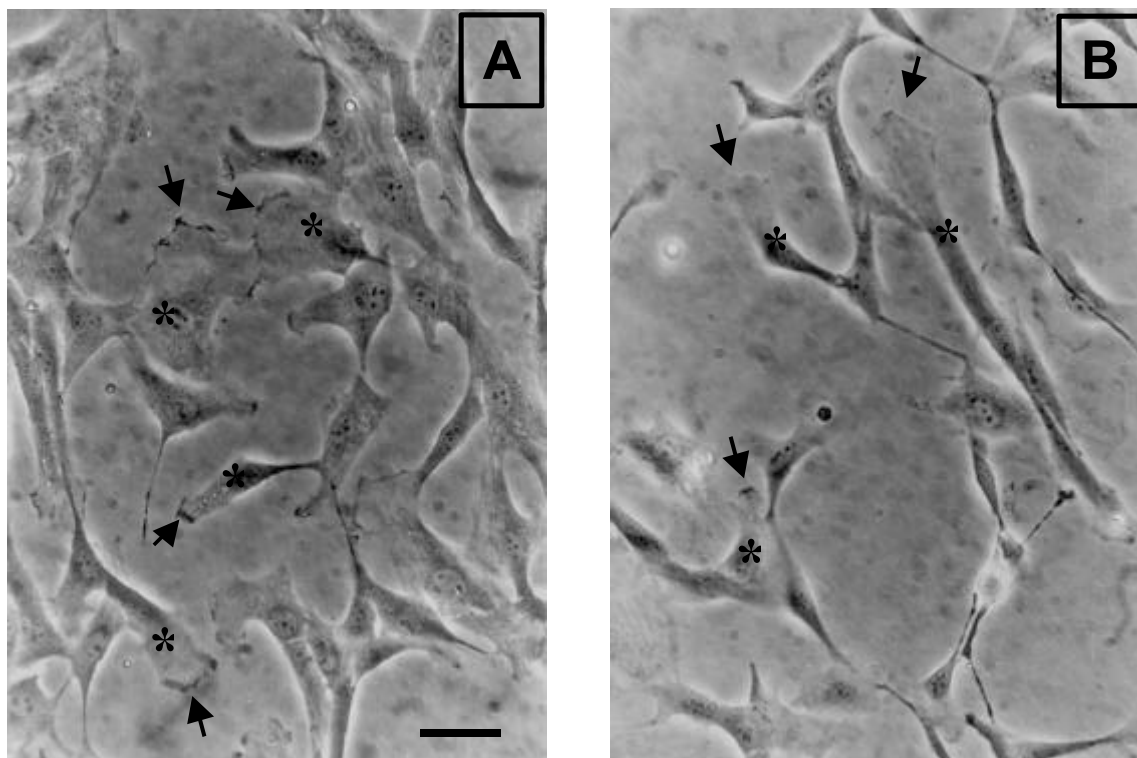
## 2.11 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's t-test für gepaarte, beziehungsweise ungepaarte Stichproben geprüft, wobei das Signifikanzniveau bei  $p < 0,05$  lag.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Stabile Transfektion

Etwa eine Woche nach der Transfektion der MDCK-F-Zellen mit dem ROMK2-Kanal und der Selektion mit dem Antibiotikum Geneticin begannen die meisten Zellen abzustarben. In dieser Zeit wurde das Kulturmedium öfters ausgetauscht, um kein totes Zellmaterial in den Kulturschalen zu belassen. Nach einer weiteren Woche verblieben in den Schalen lediglich einzelne Zellkolonien. Die Zellen in diesen Anhäufungen hatten die gleiche Morphologie wie MDCK-F-Zellen (siehe Abbildung 6).



*Abb. 6: Aufnahmen aus der Zellkultur. Diese Photographien zeigen, daß vor (A) und nach (B) der Transfektion die für die MDCK-F-Zellen typische Morphologie zu erkennen ist: Die Zellen lassen ein Vorderende, das Lamellipodium (Pfeil) und ein Hinterende, den Zelleib (Stern), erkennen (Balken entspricht 20 µm).*

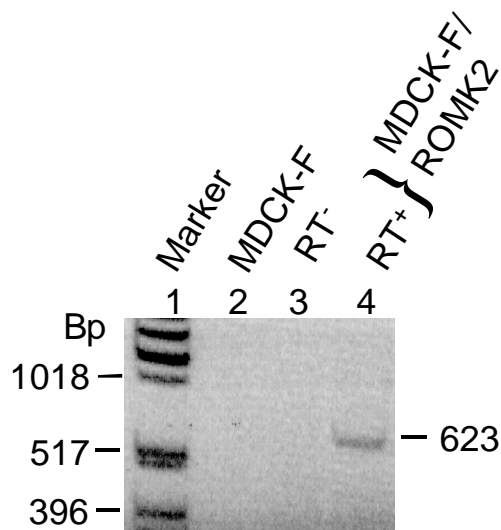


Unter dem Mikroskop wurden unter sterilen Bedingungen aus diesen Kolonien einzelne Zellen isoliert und in kleinere Kulturschalen mit Medium übertragen. Es konnten acht stabile MDCK-F/ROMK2-Zellklone gewonnen werden. Nach der Transfektion der MDCK-F-Zellen mit dem Leervektor pcDNA3 konnten drei mock-transfizierte Klone nach selbigem Schema isoliert werden.

Auch bei diesen Zellen führte die Transfektion zu keiner Änderung der Morphologie.

### **3.2 RT-PCR-Versuche**

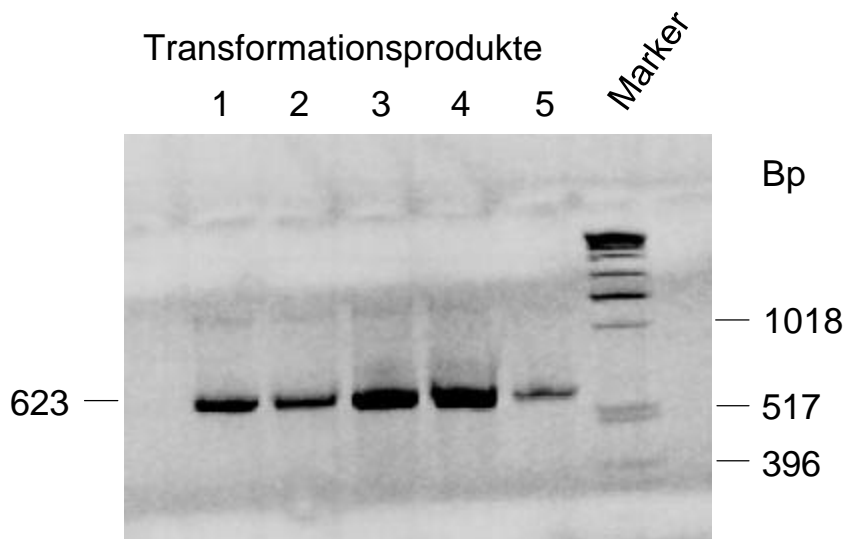
Die RNA der ROMK2-transfizierten Zellklone war das Ausgangsmaterial für den Nachweis der erfolgreichen Transfektion mittels der RT-PCR. Nach Herstellung der cDNA mit der reversen Transkriptase wurden alle Proben mit dieser Methode untersucht. Lediglich bei einem Zellklon ließ sich das zu erwartende Amplifikat mit einer Größe von 623 Basenpaaren nachweisen. Dieser Klon wurde ab diesem Zeitpunkt für alle weiteren Experimente verwendet. Aus der cDNA der nativen MDCK-F-Zellen und der Negativkontrolle RT konnte kein ROMK2-Fragment amplifiziert werden.



*Abb. 7: RT-PCR-Nachweis der erfolgreichen ROMK2-Transfektion. Abbildung eines Polyacrylamidgels. In diesem wurden in den Taschen 1-4 folgende Proben aufgetragen: 1. Der Marker dient als Längenstandard.*

- 2. Bei nicht-transfizierten MDCK-F-Zellen ließ sich kein Fragment nachweisen.*
- 3. RT-Ansatz, bei dessen cDNA-Synthese das Enzym reverse Transkriptase fehlte, enthält ebenfalls kein ROMK2-Fragment.*
- 4. Hingegen war das erwartete Fragment mit einer Größe von 623 Basenpaaren beim RT<sup>+</sup>-Ansatz eines ROMK2-transfizierten Zellklons nachzuweisen (rechts).*

Das PCR-Produkt wurde in den pcR2.1-Vektor einkloniert und danach in Bakterien transformiert. Von den vermeintlich positiven weißen Bakterienkolonien ergab sich durch die folgende PCR eine Bestätigung, daß es sich um ROMK2-positive Kolonien handelte. Abbildung 8 zeigt, daß in allen Kolonien das ROMK2-Fragment nachzuweisen war. Somit war die Umklonierung erfolgreich.



*Abb. 8: Agarosegel einer PCR von Bakterienkolonien. Das Amplifikat mit einer Größe von 623 Basenpaaren konnte durch einen erneuten PCR-Versuch in allen untersuchten Bakterienkolonien nachgewiesen werden.*

Um ein falsch positives PCR-Ergebnis auszuschließen, führte ich einen Restriktionsverdau durch, wobei das ROMK2-Fragment aus allen Plasmiden herausgeschnitten werden konnte. Nach diesem Ergebnis wurde eine der Bakterienkolonien für eine Sequenzierung herangezogen. Nach erneuter Vervielfältigung des ROMK2-Fragments in Bakterienkulturen konnte die Firma MWG Biotech (Ebersberg) bei der Sequenzierung feststellen, daß es sich bei dem PCR-Produkt um ein Fragment des ROMK2-Kanals handelte. Damit hatte ich auf mRNA-Ebene zweifelsfrei nachgewiesen, daß der untersuchte MDCK-F-Zellklon mit dem ROMK2-Kanal transfiziert war

### **3.3 Patch-Clamp-Experimente**

Ziel der Patch-Clamp-Experimente war es, den funktionellen Einbau des ROMK2 in die Plasmamembran der MDCK-F-Zellen zu zeigen. Bei den Kontrollzellen (n=6) (Mock-transfizierte Zellen, siehe Abbildung 10 A) ergab sich in physiologischer Ringerlösung ein Strom mit geringer Amplitude, dessen Umkehrpotential bei annähernd 0 mV lag. Das spricht dafür, daß kein nennenswerter K<sup>+</sup>-Strom vorhanden ist. Es kann davon ausgegangen werden,

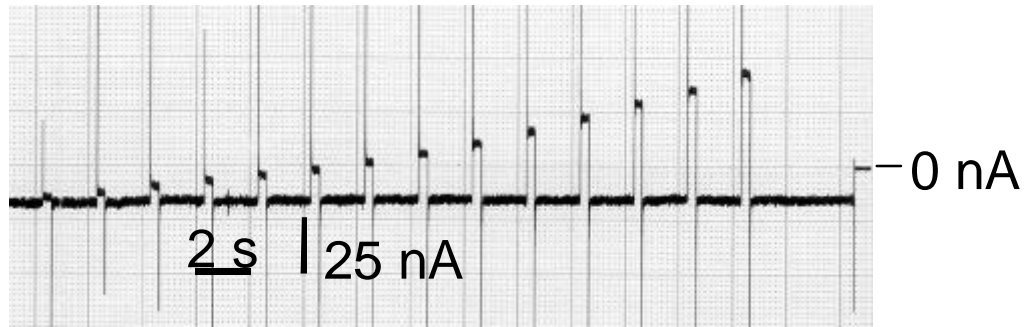
daß es sich dabei vor allem um  $\text{Cl}^-$ -Ströme handelt, deren Umkehrpotential bei den verwendeten Lösungen 0 mV beträgt.

Die Expression des ROMK2-Kalium-Kanals ruft einen charakteristischen, leicht einwärtsgerichteten Kalium-Strom hervor [18]. Das heißt, bei identischen Triebkräften zwischen Zelle und Außenmedium leitet der Kanal die Kaliumionen besser in die Zelle als aus der Zelle heraus. Entsprechend ist die Amplitude für einwärts gerichteten Strom größer als die für auswärts gerichteten Strom.

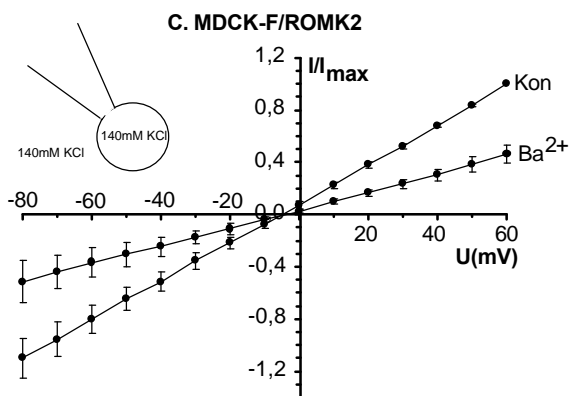
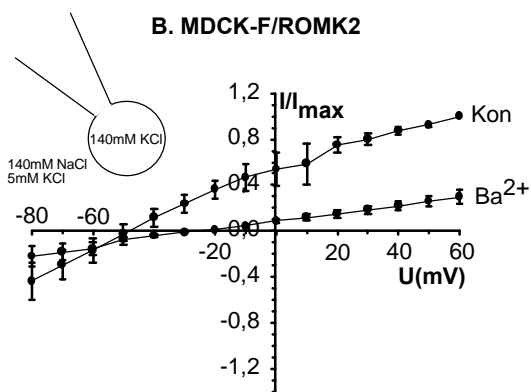
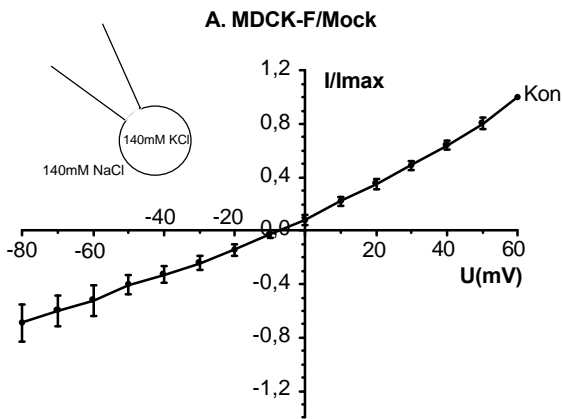
Die Abbildung 9 zeigt die Originalaufzeichnung der Messung einer ROMK2-transfizierten MDCK-F-Zelle in physiologischer Ringerlösung. Die Werte dieser Ausdrücke wurden gemittelt, normiert und sind in Abbildung 10 B dargestellt. Wie die Abbildung 10 B zeigt, liegt das Umkehrpotential deutlich negativer als bei den Mock-transfizierten Zellen, nämlich bei circa  $-50$  mV. Oft war dabei ein „Run-Down“-Phänomen zu beobachten, das typisch für diesen Kalium-Kanal ist [48]. Dieser Effekt äußert sich in einem Verlust des ROMK2-kennzeichnenden Kaliumstromes nach einer bestimmten Versuchszeit. Dem konnte entgegengewirkt werden, indem der Pippettenlösung jeweils 0,1 mmol/l ATP zugegeben wurde. Der „Run-Down“ konnte dadurch hinausgezögert werden.

Abbildung 10 B zeigt darüber hinaus ein weiteres Charakteristikum des ROMK2-Kanals. Durch die Zugabe von Bariumionen konnte gezeigt werden, daß der  $\text{K}^+$ -Strom durch den Einbau des ROMK2 zustande kam. Der Strom durch diesen Kanal ist gut hemmbar durch Bariumionen ( $\text{Ba}^{2+}$ ) im Extrazellulärmilieu [48]. Nach der Zugabe von 5 mmol/l Bariumchlorid senkte sich die Stromamplitude ab und das Umkehrpotential verschob sich in Richtung 0 mV.

In weiteren Experimenten wurde die  $\text{K}^+$ -Selektivität des neu aufgetretenen Stromes überprüft. ROMK2-transfizierte Zellen wurden sowohl unter physiologischen Bedingungen ( $n=10$ ) mit einer extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mmol/l (Abb. 10 B), als auch unter Bedingungen mit einer hohen extrazellulären Kaliumkonzentration von 140 mmol/l untersucht ( $n=7$ , Abb. 10 C). In Abbildung 10 C sind die Versuche von ROMK2-transfizierten Zellen in Ringerlösung mit hohem Kaliumgehalt (140mmol/l) zusammengefaßt. Wie für einen  $\text{K}^+$ -selektiven Kanal zu erwarten, verschiebt sich bei ausgeglichenen Ionenverhältnissen auf beiden Seiten der Zellmembran das Umkehrpotential gegen 0mV. Auch hier ist ein eindeutiger Rückgang der Stromamplitude nach  $\text{Ba}^{2+}$ -Ionen-Gabe zu verzeichnen. Diese Ergebnisse bestätigten den Einbau von funktionellen ROMK2-Kanalproteinen in die Zellmembran der transfizierten MDCK-F-Zellen.



*Abb. 9: Originalaufzeichnung eines typischen Patch-Clamp-Experiments bei physiologischem  $K^+$ -Gradienten. Die dicke, nahezu durchgehende Linie zeigt den Strom bei der Haltespannung von  $-80$  mV. Die verschieden großen Ausschläge sind die Stromantworten, mit denen die Zelle auf die Spannungspulse des Patch-Clamp-Verstärkers „antwortet“.*



**Abb. 10 A-C: Diagramme, die den Einbau funktioneller ROMK2-Proteine in den transfizierten MDCK-F-Zellen zeigen.**

A. Mock-transfizierte MDCK-F-Zellen in physiologischer Ringerlösung. Das Umkehrpotential liegt bei etwa 0 mV. Das heißt, in diesen Zellen ist kein  $K^+$ -Strom nachzuweisen.

B. ROMK2-transfizierte Zellen in physiologischer Ringerlösung. Das Umkehrpotential liegt bei ca. -50 mV. Nach Zugabe von  $Ba^{2+}$  fällt die Stromamplitude deutlich ab und das Umkehrpotential verschiebt sich zu positiveren Werten.

C. ROMK2-transfizierte Zellen in Hochkalium-Ringerlösung (140mmol/l). Das Umkehrpotential verschiebt sich gegen 0 mV und die Stromamplitude nimmt nach Gabe von  $Ba^{2+}$  ab.

### 3.4 Migrationsexperimente

Diese Versuche sollten zeigen, ob sich der Einbau des ROMK2-Kanals in die Zellmembran der MDCK-F-Zellen auf das Migrationsverhalten auswirkt. Dazu wurden ROMK2-transfizierte Zellen und zur Kontrolle auch Mock-transfizierte Zellen untersucht. Damit sollte ausgeschlossen werden, daß die Transfektion an sich die Migration beeinflusst. Unter Kontrollbedingungen ergab sich mit HEPES-gepufferter Ringerlösung für Kontrollzellen (Mock-transfiziert) eine durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von  $1,04 \pm 0,04 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 20$ ). Diese Geschwindigkeit entspricht genau derjenigen von untransfizierten MDCK-F-Zellen [39]. Die ROMK2-transfizierten Zellen wanderten mit einer Geschwindigkeit von  $0,74 \pm 0,02 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $n = 21$ ). Der Einbau ROMK2-Kanals senkt damit die Migrationsgeschwindigkeit signifikant um fast 30%.

Das kann als weiterer Hinweis dafür gewertet werden, daß sich funktionelle Kanalproteine in der Zellmembran der ROMK2-transfizierten MDCK-F-Zellen befinden müssen.

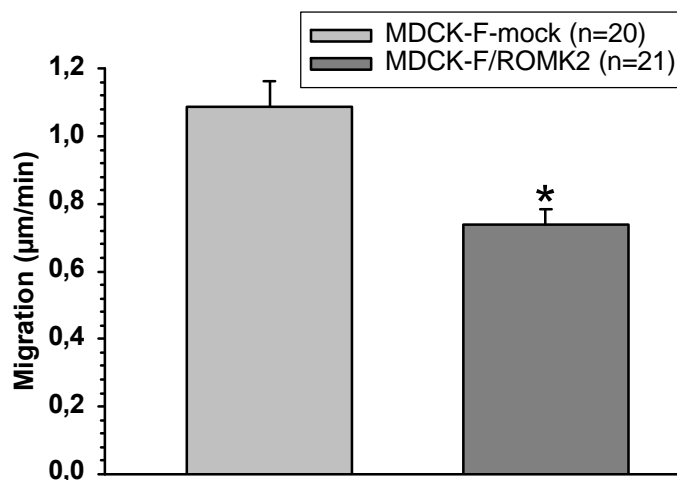


Abb. 11: Migrationsexperimente. Die Grafik zeigt die Durchschnittsgeschwindigkeiten von Mock-transfizierten Zellen und ROMK2-transfizierten Zellen. Letztere migrieren um circa 30% langsamer.

### **3.5 Verteilung des ROMK2 in migrierenden MDCK-F-Zellen**

Um die Kernfrage nach der Lokalisation des ROMK2-Kanalproteins in den transfizierten MDCK-F-Zellen zu klären, wurden Versuche mit indirekter Immunfluoreszenz durchgeführt. Vorhergehende Versuche, bei denen Markerproteine der basolateralen Zellmembran an der Führungskante des Lamellipodiums der MDCK-F-Zellen nachgewiesen werden konnten, sollten als Vergleich dienen. Dabei wurde wiederum besonderes Interesse auf die Führungskante der migrierenden MDCK-F-Zellen gelegt. Von Interesse war dabei herauszufinden, ob auch der ROMK2, ein Markerprotein der apikalen Membran von Epithelzellen, an der Führungskante lokalisiert sein würde oder nicht. Der gegen den ROMK2 gerichtete, polyklonale Antikörper wurde schon verwendet, um den ROMK2 in Nierentubuluszellen nachzuweisen [15]. Kontrollexperimente wurden durchgeführt, um eine unspezifische Anfärbung auszuschliessen. Hierbei wurde das Versuchsprotokoll auf Mock-transfizierte MDCK-F-Zellen angewendet, beziehungsweise bei ROMK2-transfizierten Zellen der 1. Antikörper weggelassen und nur mit dem 2. Antikörper angefärbt.

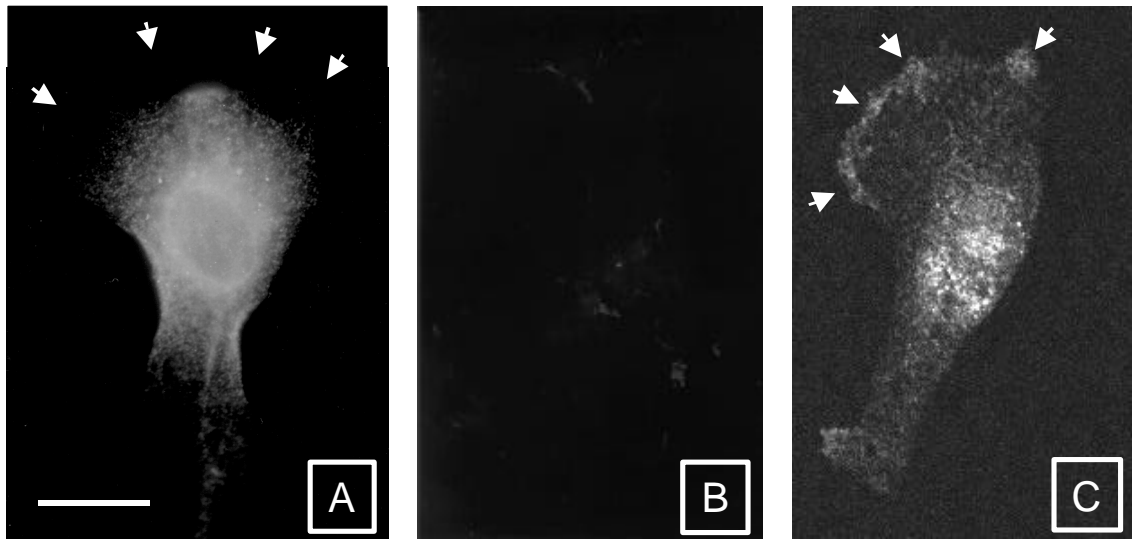
Wie die Abbildung 12 A zeigt, konnte der transfizierte ROMK2-Kanal diffus über den Zelleib der migrierenden MDCK-F-Zelle verteilt nachgewiesen werden. An der Führungskante des Lamellipodiums der ROMK2-transfizierten Zellen war keine Farbmarkierung durch die Antikörper zu beobachten (Pfeile). Eine starke Anfärbung war um die Kernregion der Zellen zu beobachten. Das ist damit zu erklären, daß die Zelle an dieser Stelle am dicksten ist. Dort hat sie die „meiste Substanz“ und es überlagern sich vermutlich in diesem Bereich Signale intrazellulären Ursprungs im Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat.

Wie zu erwarten, war in den Mock-transfizierten MDCK-F-Zellen keine spezifische Anfärbung durch den ersten oder den zweiten Antikörper nachzuweisen. Ebenso waren die Anfärbungen ohne den ersten Antikörper negativ. (siehe Abbildung 12 B). Die ROMK2-Proteine sind demnach in den migrierenden Zellen anders verteilt als „basolaterale“ Proteine.

Um zu zeigen, daß in den transfizierten MDCK-F-Zellen auch andere Markerproteine differenziert nachzuweisen sind, wurden Experimente mit Antikörpern gegen den Chlorid-Bikarbonat-Austauscher (AE2) durchgeführt. Wie in vorhergehenden Experimenten [23] konnte dieser, im Gegensatz zum ROMK2, an der Führungskante des Lamellipodiums nachgewiesen werden (Abbildung 12 C).

Dies zeigt, daß durch die Transfektion mit dem ROMK2 die Verteilung von anderen Proteinen in den migrierenden MDCK-F-Zellen nicht beeinflußt wird.





*Abb. 12: Immunfluoreszenzversuche.*

*A. Anfärbung des ROMK2 in Führungskante des Lamellipodiums (Pfeilmarkierungen den transfizierten MDCK-F-Zellen. Das Kanalprotein verteilt sich diffus in den Zellen. Es ist keine Anreicherung an der) nachzuweisen (Balken entspricht 20 µm).*

*B. In Mock-transfizierten MDCK-F-Zellen war kein ROMK2-Kanalprotein nachzuweisen.*

*C. Auch in ROMK2-transfizierten MDCK-F-Zellen ist der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  - Austauscher (AE2) am Vorderende der Zelle angereichert (Pfeilmarkierungen).*

## 4. Diskussion

MDCK-F-Zellen haben den typischen morphologischen Aufbau von migrierenden Zellen. Man kann an ihnen klar ein Vorderende (Lamellipodium) von einem Hinterende (Zelleib) unterscheiden [16, 36]. Die Migration wird sowohl durch dynamische Umbauvorgänge des Zytoskeletts [3], als auch von polarisiert in der Membran verteilten Ionenkanälen und –austauschern unterstützt [37]. Dabei kommt es zu einem engen Zusammenspiel dieser beiden Komponenten. Die Ionenkanäle und –transporter schaffen unter anderem durch Einstellen des Zellvolumens das intrazelluläre Milieu für das optimale Funktionieren der zytoskelettalen „Migrationsmaschine“ [33]. Ohne die Polarisierung der migrierenden Zellen wäre die Migration nicht möglich, da in diesem Fall nicht definiert wäre, an welchem Ende der Zelle das Zytoskelett erweitert und an welchem Ende es abgebaut werden müsste. Dabei betrifft die Polarisierung sowohl das Zytoskelett als auch die Verteilung und Funktion von Membranproteinen. Der unterschiedlichen Verteilung von Ionenkanälen und –transportern liegt ein unterschiedliches ‚Sorting‘ zugrunde. Dabei handelt es sich um den Transport von Membranproteinen auf dem Weg vom endoplasmatischen Retikulum, dem Ort der Proteinbiosynthese, über das Trans-Golgi-Netzwerk in bestimmte Bereiche der Zellmembran, dem Bestimmungsort. Die unterschiedliche Verteilung von Membranproteinen ist für die korrekte Funktionsweise, zum Beispiel von Epithelzellen, von großer Bedeutung. Bei Epithelzellen wurde das ‚Sorting‘ und folglich die unterschiedliche Membranproteinverteilung bisher gut beschrieben [8, 13, 20, 21, 46]. Für das ‚Sorting‘ werden unter anderem Sequenzabschnitte in den jeweiligen Proteinen verantwortlich gemacht. Ein solches „Sorting-Motiv“, das den Transport eines Proteins zur basolateralen Membran in Epithelien hervorruft, ist das Dileucin (LL) [4]. Genau dieses Dileucin-Motiv ist auch verantwortlich für den Transport eines  $\text{Ca}^{2+}$ -empfindlichen  $\text{K}^+$ -Kanals zum Vorderende in migrierenden Zellen [41]. Damit war die Korrelation zwischen basolateraler Membran im Epithel einerseits und dem Vorderende in migrierenden Zellen andererseits gezeigt. Besitzt ein Protein kein bestimmtes Motiv, so wird es zur apikalen Zellmembran transportiert oder diffus in Epithelzellen verteilt [13]. Die Anreicherung von bestimmten „basolateralen“ Ionentransportern am Vorderende der migrierenden Zelle ist ebenso von großer Bedeutung für die Migration.

Das Ziel meiner Arbeit war, herauszufinden, ob es bei migrierenden MDCK-F-Zellen, wie bei polarisierten Epithelzellen verschiedene Wege für den Proteintransport in die Zellmembran geben würde. Es war bis dahin ungeklärt, wo sich in den migrierenden Zellen ein Protein der

apikalen Epithelzellmembran wiederfinden würde. Um dieser Frage nachzugehen, transfizierte ich den apikalen  $K^+$ -Kanal ROMK2 [15] in die migrierenden MDCK-F-Zellen. Die stabile Transfektion wurde durch molekularbiologische und elektrophysiologische Experimente bewiesen. Zum Nachweis der Funktionalität von ROMK2-Kanalproteinen in der Zellmembran der transfizierten MDCK-F-Zellen wurden Patch-Clamp-Experimente durchgeführt. Eindeutig ist eine Verringerung der Stromamplitude nach Zugabe des Kalium-Kanal-Blockers Bariumchlorid ( $BaCl_2$ ) zu erkennen. Diese Beobachtungen wurden zuvor auch in anderen Studien über die Eigenschaften des ROMK2 gemacht [11, 45]. Um dem „Run-Down“-Phänomen entgegenzuwirken und die Offenwahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) der ROMK2-Kanäle zu erhöhen, wurde der Pipettenlösung bei diesen Experimenten ATP zugegeben [48].

Ganz offensichtlich hat der Einbau des ROMK2-Kanals auch einen Einfluß auf das Migrationsverhalten. Das Ergebnis der um 30% herabgesetzten Migrationsgeschwindigkeit korreliert mit einer früheren Studie. Die pharmakologische Aktivierung des endogenen  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanals senkte die Migrationsgeschwindigkeit der MDCK-F-Zellen um 20-40% [39]. Ebenso wie die Aktivierung des  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanals ruft auch der Einbau des ROMK2-Kanals in die Membran von MDCK-F-Zellen eine erhöhte  $K^+$ -Kanalaktivität hervor, was zum Beispiel durch eine Veränderung der Volumenhomöostase zu einer Verringerung der Migrationsgeschwindigkeit führt. Die Volumenhomöostase ist eng mit der Migrationsfähigkeit verbunden [32].

Die Beobachtung, daß der ROMK2-Kanal diffus in der Plasmamembran der migrierenden MDCK-F-Zellen verteilt ist und keine Anreicherung an der Vorderkante des Lamellipodiums nachgewiesen werden konnte, deckt sich auch mit den Überlegungen über das Migrationsmodell, das in der Einleitung schon angesprochen wurde: Am Lamellipodium der migrierenden Zelle tragen zum Beispiel die beiden Ionenaustauscher AE2 und NHE1, über die Aufnahme von  $Na^+$  und  $Cl^-$ , zur Zunahme des Volumens bei [14]. Dieses Volumen muß, um der Volumenhomöostase gerecht zu werden, auch wieder abgegeben werden. In nativen Zellen geschieht das durch die oszillierende Aktivität des endogenen  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ -Kanals [32]. Diese oszillierende  $K^+$ -Kanalaktivität wird in den transfizierten Zellen durch die permanente Aktivität des ROMK2 überlagert und damit wird der Einfluß auf die Migration offensichtlich abgeschwächt. Möglicherweise spielt dabei eine veränderte Volumenhomöostase eine wichtige Rolle [39].

Ähnliche Beobachtungen zur Lokalisation apikaler Markerproteine wurden zuvor mit dem Influenzavirus-Hämagglutinin gemacht [23]. Auch ein apikaler Ionentransporter ( $Na^+/H^+$ -

Austauscher NHE3) konnte nicht am Vorderende migrierender Zellen nachgewiesen werden, sondern ist diffus in der Plasmamembran verteilt [43].

Wichtig ist auch festzuhalten, daß das ROMK2-Protein trotz Überexpression in den MDCK-F-Zellen nicht an der Vorderkante des Lamellipodiums angereichert ist. Meine Befunde unterstützen daher die Hypothese, daß es auch bei migrierenden Zellen unterschiedliche Sorting-Mechanismen gibt, die den apikalen und basolateralen Transportwegen in normal polarisiertem Epithel entsprechen. Dabei bleibt zu klären, ob es sich bei den transformierten MDCK-F-Zellen um die gleichen oder um ähnliche Sorting-Motive handelt, wie man sie aus den unveränderten Epithelzellen kennt.

Die Untersuchungen über die Zusammenhänge von Ionenkanälen und –transportern und der Migration von Zellen befinden sich in einer frühen Phase. Das zuvor beschriebene Modell der migrierenden Zelle bedarf noch vieler Studien zur Klärung wichtiger Sachverhalte, zum Beispiel wie der Ionen-transport die zytoskelettalen Vorgänge beeinflusst und durch welche Mechanismen die Proteine zu den bestimmten Membrandomänen gelangen.

Gerade im Hinblick auf die Tatsache, daß circa 90% aller Tumoren epithelialen Ursprungs sind, ist es bedeutsam, solch grundlegende Fragen wie die Polarisierung von migrierenden Zellen näher zu untersuchen. Von großer Wichtigkeit scheinen mir auch die Gemeinsamkeiten und die Unterschiede zwischen Epithelzellen und migrierenden Zellen. Auf diese Art und Weise könnte die Klärung einfacher physiologischer Modelle und Zusammenhänge vielleicht eines Tages ein Gewinn für die klinische Forschung im Bereich der Neoplasien und ihrer Metastasen sein.

## 5. Zusammenfassung

Die Zellmigration hat eine große Bedeutung in essentiellen Prozessen im Säugerorganismus, wie der Tumormetastasierung, der Wundheilung, der Embryogenese oder im Immunsystem. Neben der zytoskelettalen Komponente, die den Zellen Bewegungsfähigkeit ermöglicht, sind auch Vorgänge auf ionaler Ebene von Bedeutung. Bei den in dieser Arbeit untersuchten MDCK-F-Zellen handelt es sich um transformierte Nierenepithelzellen, die ursprünglich aus der Hundeniere stammen. Für die Funktion eines Epithels ist es essentiell, daß Ionenkanäle und –transporter korrekt in die apikale und basolaterale Zellmembran eingebaut sind. Bisher war bekannt, daß Markerproteine der basolateralen Epithelzellmembran am Vorderende der migrierenden MDCK-F-Zellen lokalisiert sind. Es sollte nun geklärt werden, wo in den MDCK-F-Zellen ein Markerprotein zu finden sein würde, das sich physiologischerweise in der apikalen Membran von Epithelzellen befindet. Damit sollte ein Beitrag zur Beantwortung der Frage geleistet werden, ob in migrierenden Zellen, ebenso wie in epithelialen Zellen, Membranproteine über unterschiedliche Transportwege in die Zellemembran gelangen.

Die Zellen wurden dazu stabil mit dem Kalium-Kanal ROMK2 transfiziert, ein Protein das in der apikalen Zellmembran von Sammelrohrepithelzellen der Niere zu finden ist. Der Erfolg der Transfektion wurde durch RT-PCR-Versuche nachgewiesen. Ganzzell-Patch-Clamp-Experimente wurden durchgeführt, um den Einbau funktioneller ROMK2-Kanalproteine in die Zellmembran der transfizierten MDCK-F-Zellen zu beweisen. Migrationsexperimente haben gezeigt, daß sich der Einbau des Kanals auf die Migration der transfizierten Zellen auswirkt. Mit der Immuncytochemie wurde die Lokalisation des ROMK2 in den migrierenden Zellen geklärt. Folgende Ergebnisse zeigten sich:

- RT-Polymerasekettenreaktion und die anschließende Sequenzierung des PCR-Produkts wiesen nach, daß die MDCK-F-Zellen stabil mit dem ROMK2-Kanal transfiziert wurden.
- Die Expression des ROMK2-Kanals in den transfizierten MDCK-F-Zellen ruft einen  $Ba^{2+}$ -hemmbaren  $K^+$ -Strom hervor, der in den Wildtyp- und Mock-transfizierten Zellen nicht nachzuweisen war.
- Die Transfektion mit dem ROMK2 senkt die Migrationsgeschwindigkeit der MDCK-F-Zellen um circa 30%.
- Das ROMK2-Kanalprotein ist diffus in der Zellmembran der transfizierten migrierenden Zellen verteilt. Sein Einbau beeinflusst nicht die Anreicherung des  $Cl^-/HCO_3^-$  -Austauschers (AE2) am Vorderende der MDCK-F-Zellen.

Ein apikales Markerprotein (ROMK2) hat demnach eine von den basolateralen Proteinen unterschiedliche Lokalisation in den migrierenden MDCK-F-Zellen. Das deutet darauf hin, daß es in den migrierenden Zellen wie in den polarisierten Epithelzellen unterschiedliche Transportwege für Proteine zur Zellmembran gibt.

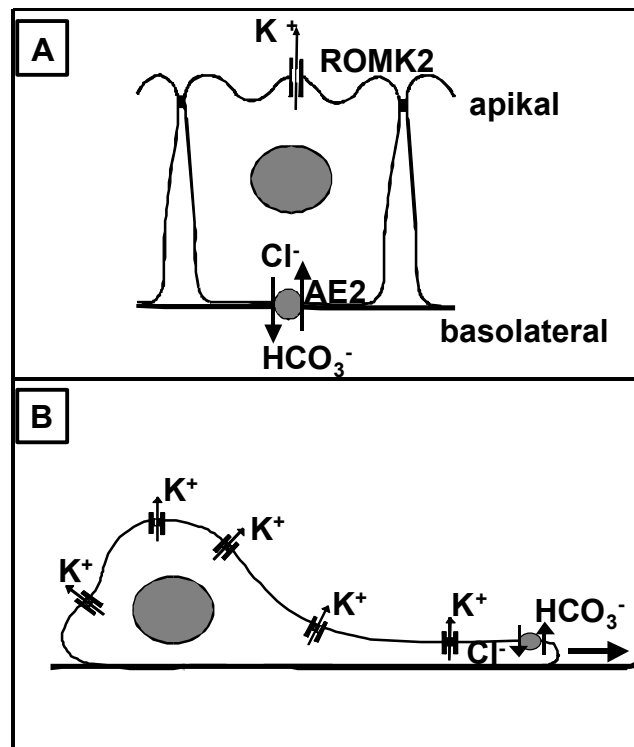


Abb. 13: **Zusammenfassung.** Diese Schemazeichnung faßt zusammen, daß basolaterale Membranproteine in migrierenden Zellen am Vorderende lokalisiert sind, wohingegen apikale Markerproteine diffus verteilt sind.

## Abkürzungen:

AE2	Chlorid-Bikarbonat-Austauscher
ATP	Adenosin-triphosphat
cDNA	copy DNA
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotid-triphosphat
DTT	Dithiothreitol (Cleland's reagent)
1-EBIO	1-Ethyl-2-benzimidazol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosidase
Kir	Einwärtsgerichteter Kalium-Kanal (Kalium inward rectifier)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MDCK	Madin-Darby-Canine-Kidney
MDCK-F	Madin-Darby-Canine-Kidney Focus
MEM	Minimum Essential Medium
MOPS	3-(N-Morpholin)-Propansulfonsäure
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonukleinsäure
ROMK	Rat outer medulla potassium channel
RT	Reverse Transkriptase
TBE	Tris/Borate/EDTA-Puffer
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactosid

## Literaturverzeichnis

1. Babenko A. P., Aguilar-Bryan L., Bryan J. (1998) A view of SUR/K<sub>IR6.X</sub>, K<sub>ATP</sub> channels. *Annu. Rev. Physiol.* 60:667-687
2. Bauer C. (1996) Blut: Ein flüssiges Organsystem. *Lehrbuch der Physiologie*, Hrsg.: Klinker R., Silbernagl S., Georg Thieme Verlag, S.:185-212
3. Bretscher M. S. (1996) Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells. *Cell* 87:601-606
4. Brown D. (2000) Targeting of membrane transporters in renal epithelia: when cell biology meets physiology. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278:F192-F201
5. Condeelis J. (1993) Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9:411-444
6. Doupnik C. A., Davidson N., Lester H. A. (1995) The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Op. Neurobiol.* 5:268-277
7. Friedl P., Bröcker E. B. (2000) The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000):41-64
8. Grinstein S., Woodside M., Waddell T. K., Downey G. P., Orłowski J., Pouyssegur J., Wong D. C. P., Foskett J. K. (1993) Focal localization of the NHE-1 isoform of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport: assessment of effects on intracellular pH. *EMBO J.* 12/13:5209-5218
9. Guilford W. H., Lantz R. C., Gore R. W. (1995) Locomotive forces produced by single leukocytes in vivo and in vitro *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 268:C1308-C1312
10. Hamill, O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100
11. Hebert S. C. (1995) An ATP-regulated, inwardly rectifying potassium channel from rat kidney (ROMK). *Kidney Int.* 48:1010-1016
12. Ho K., Nichols C. G., Lederer W. J., Lytton J., Vassilev P. M., Kanazirska M. V., Hebert S. C. (1993) Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-re-gulated potassium channel. *Nature* 362:31-38
13. Keller P., Simons K. (1997): Post-golgi biosynthetic trafficking. *J. Cell Sci.* 110:3001-3009
14. Klein M., Seeger P., Schuricht B., Alper S. L., Schwab A. (2000) Polarization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers in migrating renal epithelial cells. *J. Gen. Physiol.* 115:599-607



15. Kohda Y., Ding W., Phan E., Housini I., Wang J., Star R. A. Huang C. -L. (1998) Localization of the ROMK potassium channel to the apical membrane of distal nephron in rat kidney. *Kidney Int.* 54: 1214-1223
16. Lauffenburger D. A., Horwitz A. F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359-369
17. MacGregor G., Xu J. Z., McNicholas C. M., Giebisch G., Hebert S. C. (1998) Partially active channels produced by PKA site mutation of the cloned renal K<sup>+</sup> channel, ROMK2 (kir1.2). *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 275:F415-F422
18. Mañes S., Mira E., Gómez-Moutón C., Lacalle R. A., Keller P., Labrador J. P., Martínez-A C. (1999) Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *EMBO J* 18:6211-6220
19. Maout S. Le, Sewing S., Coudrier E., Elalouf J. M., Pongs O., Merot J. (1996) Polarized targeting of a Shaker-like (A-type) K<sup>+</sup> -channel in the polarized epithelial cell line MDCK. *Mol. Membrane Biol.* 13:143-147
20. Matlin K. S., Caplan M. J. (1992) Epithelial cell structure and polarity. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology, Chapter 16:*447-468
21. Matter K., Mellman I. (1994) Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Op. Cell Biol.* 6:545-554
22. Mitchison T. J., Cramer L. P. (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84:371-379
23. Müsch A., Xu H., Shields D., Rodriguez-Boulan E. (1996) Transport of vesicular stomatitis virus G protein to the cell surface is signal mediated in polarized and nonpolarized cells. *J. Cell Biol.* 133:543-558
24. Nabi I. R. (1999) The polarization of the motile cell. *J. Cell Sci.* 112:1803-1811
25. Nichols C. G., Lopatin A. N. (1997) Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59:171-191
26. Oberleithner H., Westphale H.J., Gaßner B. (1991) Alkaline stress transforms Madin-Darby-Canine-Kidney cells. *Pflügers Arch.* 419:418-420
27. Peränen J., Auvinen P., Virta H., Wepf R., Simons K. (1996) Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 1135:153-167
28. Reinhardt J., Golenhofen N., Pongs O., Oberleithner H., Schwab A. (1998) Migrating transformed MDCK cells are able to structurally polarize a voltage-activated K<sup>+</sup> channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5378-5382

29. Röhl A., Wulf A., Schuricht B., Schwab A. (2000) K<sup>+</sup> channel (hIK1) dependent migration of human neutrophil granulocytes. *Pflügers Arch.* 439:R447 (Abstract)
30. Rosengren S., Henson P. M., Worthen G. S., (1994) Migration-associated volume changes in neutrophils facilitate the migratory process in vitro. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 267:C1623-C1632
31. Sánchez-Madrid F., Angel del Pozo M. (1999) Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18:501-511
32. Schneider S. W., Pagel P., Rotsch C., Danker T., Oberleithner H., Radmacher M., Schwab A. (2000) Volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic force microscopy. *Pflügers Arch.* 439:297-303
33. Schwab A. (2001) Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280:F739-47
34. Schwab A. (2001) Ion channels and transporters on the move. *NIPS* 16:29-31
35. Schwab A., Finsterwalder F., Kersting U., Danker T., Oberleithner H. (1997) Intracellular Ca<sup>2+</sup> distribution in migrating transformed renal epithelial cells. *Pflügers Arch.* 434:70-76
36. Schwab A., Gabriel K., Finsterwalder F., Folprecht G., Greger R., Kramer A., Oberleithner H. (1995) Polarized ion transport during migration of transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Pflügers Arch.* 430:802-807
37. Schwab A., Oberleithner H. (1996) Plasticity of renal epithelial cells: the way a potassium channel supports migration. *Pflügers Arch.* 432:R87-R93
38. Schwab A., Reinhardt J., Schneider S. W., Gassner B., Schuricht B. (1999) K<sup>+</sup> channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 9:126-132
39. Schwab A., Schuricht B., Seeger P., Reinhardt J., Dartsch P. C. (1999) Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K<sup>+</sup> channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Pflügers Arch.* 438:330-337
40. Schwab A., Wojnowski L., Gabriel K., Oberleithner H. (1994) Oscillating activity of a Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channel. A prerequisite for migration of transformed Madin-Darby Canine Kidney Focus Cells. *J. Clin. Invest.* 93:1631-1636
41. Schwab A., Wulf A., Schulz C., Reinhardt J., Weinhold D., Hebert S. C., Silbernagl S. (2001) Subcellular distribution of Ca<sup>2+</sup> sensitive K<sup>+</sup> channels (IK1) in migrating cells. (eingereicht)

42. Servant G., Weiner O. D., Herzmark P., Balla T., Sedat J. W., Bourne H. R. (2000) Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* 287:1037-1040
43. D' Souza S., Garcia-Cabado A., Yu F., Teter K., Lukacs G., Skorecki K., Moore HP., Orłowski J., Grinstein S. (1998) The epithelial sodium-hydrogen antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger 3 accumulates and is functional in recycling endosomes. *J. Biol. Chem.* 273:2035-43
44. Stetler-Stevenson W. G., Aznavoorian S., Liotta L. A. (1993) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:541-573
45. Wald H., Garty H., Palmer L. G., Popovtzer M. M. (1998) Differential regulation of ROMK expression in kidney cortex and medulla by aldosterone and potassium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 275:F239-F245
46. Wandinger-Ness A., Bennett M. K., Antony C., Simons K. (1990) Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J. Cell Biol.* 111:987-1000
47. Wang W., Giebisch G. (1991) Dual modulation of renal ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel by protein kinases A and C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9722-9725
48. Wang W., Schwab A., Giebisch G. (1990) Regulation of small-conductance  $\text{K}^+$  channel in apical membrane of rat cortical collecting tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 259:F494-F502
49. Westphale H. J., Wojnowski L., Schwab A., Oberleithner H. (1992) Spontaneous membrane potential oscillations in Madin-Darby-Canine-Kidney cells transformed by alkaline stress. *Pflügers Arch.* 421:218-223
50. Xu J. Z., Hall A. E., Peterson L. N., Bienkowski M. J., Eessalu T. E., Hebert S. C. (1997) Localization of the ROMK protein on apical membranes of rat kidney nephron segments. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 273:F739-F748
51. Xu Z. C., Yang Y., Hebert S. C. (1996) Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271:9313-9319

## **Danksagung**

„Verschiebe die Dankbarkeit nie! Bezeuge sie an dem Tage, an dem Du sie empfindest!“  
(Albert Schweitzer).

Mein großer Dank an dieser Stelle gilt Herrn Professor Dr. A. Schwab für die Überlassung dieser Arbeit und die jederzeit geduldige Bereitschaft, mir bei all den grösseren und kleineren Problemen unter die Arme zu greifen.

Frau B. Schuricht danke ich für die Einweisung in die verschiedenen Labortechniken und die stetige freundliche Zusammenarbeit. Herrn Dr. G. Schwerdt danke ich für die allzeit prompte Hilfe bei der EDV. Dank an Frau A. Wulf für die Hilfe bei der Auswertung der Patch-Clamp-Experimente.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. S. Silbernagl für die Übernahme des Kor-referats und allen Mitarbeitern des Lehrstuhl I des Physiologischen Instituts der Universität Würzburg für die freundliche Aufnahme und die positive Arbeitsatmosphäre.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn M. Klein für ergebnisreiche Diskussionen innerhalb und außerhalb des Rahmens dieser Arbeit bedanken.

Diese Arbeit ist für mich auch ein Anlass, mich bei all den Personen zu bedanken, die mich während und vor dieser Arbeit begleitet und mir geholfen haben, meine Pläne zu verwirklichen. Ich danke meiner Familie, die mich immer und überall unterstützt hat. Danke an meine Freunde, die für mich da waren, wenn ich sie brauchte. Danke an alle meine Lehrer und Betreuer in der Schulzeit, die mich nach ihren Kräften gefördert haben.

## Lebenslauf

Name: Dietmar Thomas Weinhold

Geburtsdatum: 18. Juni 1974

Geburtsort: Memmingen

Eltern: Josef Weinhold  
Margot Weinhold, geb. Riedmiller

Schulbildung: Theodor-Heuss-Grundschule in Memmingen  
September 1981 – Juli 1985  
Marianum, Gymnasium der Salesianer in Buxheim  
September 1985 – Juli 1992  
Bernhard-Strigel-Gymnasium in Memmingen  
September 1992 – Juni 1994  
Abschluß mit der allgemeinen Hochschulreife am 01.07.1994

Wehrdienst: Soldat des Jagdbombergeschwaders 34 „Allgäu“, Memmingerberg  
Juli 1994 – Juni 1995

Hochschulbildung: Studium der Zahnmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-  
Universität zu Würzburg  
November 1995 – Dezember 2000  
Naturwissenschaftliche Vorprüfung Oktober 1996  
Zahnärztliche Vorprüfung April 1998  
Zahnärztliche Prüfung November 2000

Vorbereitungsassistent in freier Praxis seit Dezember 2000

Würzburg, 27.06.2001

Dietmar Weinhold