

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Die Rolle von ENaC (*epithelialer Natriumkanal*) in der
Blutdruckregulation“

verfasst von / submitted by

Kamilla Király

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2019 / Vienna, 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Rosa Lemmens-Gruber

Besonderer Dank geht an Prof. Rosa Lemmens-Gruber, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht hat. Ich möchte mich für die Gelegenheit, mich beruflich weiterzuentwickeln, bedanken. Ich habe sehr viel in Rahmen dieser Diplomarbeit gelernt.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Mohammed Aufy für die nützlichen Vorschläge während der Arbeit bedanken.

Die Fertigstellung dieser Arbeit wäre ohne die Unterstützung von den anderen Mitgliedern der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie viel schwieriger gewesen. Danke, dass ich mich immer mit meinen Fragen an euch wenden konnte.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinem Freund, Ádám dafür danken, dass sie mich während meines Studiums und des Prozesses der Abfassung dieser Arbeit immer unterstützt und ermutigt haben. Ich möchte meiner Mutter dafür danken, dass sie immer auf meiner Seite ist.

Kurzzusammenfassung

Die Blutdruckregulation ist sehr wichtig im Körper, weil Hypertonie als Risikofaktor für verschiedene Erkrankungen wie ischämischer und hämorrhagischer Schlaganfall, Myokardinfarkt, koronare Herzkrankheit, Niereninsuffizienz oder Herzinsuffizienz gilt. Zu hoher Blutdruck ist also ein wichtiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität. Als wichtigstes Ausscheidungsorgan scheidet die Niere Wasser und Natrium aus und kontrolliert dadurch den Wassergehalt des Körpers und die Natriumkonzentration im Blut. Im Endeffekt haben diese beiden Faktoren die größte Auswirkung auf den Blutdruck. Der Kanal, der für die Rückresorption von Na^+ verantwortlich ist, wird als epithelialer Natriumkanal (ENaC, *epithelial sodium channel*) bezeichnet. Der wichtigste Faktor, der die Aktivität des Ionenkanals beeinflusst, ist das Hormon Aldosteron. Außerdem sind maßgeblich für die Regulation des Kanals die proteolytische Spaltung des Kanals, Scherbeanspruchung, Vasopressin, Kanal-Palmitoylierung, Na^+ -Selbstinhibierung und die zirkadiane Uhr, welche die Arbeitsweise des Kanals und dadurch den Na^+ -Strom beeinflussen. Mutationen an dem Kanal können Erkrankungen hervorrufen. Eine Funktionssteigerung durch *gain-of-function* Mutationen des Kanals wird als Liddle Syndrom bezeichnet und ein Funktionsverlust durch *loss-of-function* Mutationen des Kanals als Pseudohypoaldosteronismus Typ 1. Symptome des Liddle Syndroms sind eine früh einsetzende Hypertonie in Verbindung mit Hypokaliämie, metabolischer Alkalose und niedriger Renin- und Aldosteron-Aktivität. Im Gegensatz dazu kommt es bei der systemischen Form von Pseudohypoaldosteronismus zu Dehydratation, Hyponatriämie, Hyperkaliämie und Hypotonie. Von dieser Form des Pseudohypoaldosteronismus sind zwei weitere Formen zu unterscheiden, die renale und die sekundäre Form.

Summary

Blood pressure regulation is very important in the body because hypertension is a risk factor for various diseases such as ischemic and hemorrhagic stroke, myocardial infarction, coronary heart disease, renal insufficiency or heart failure. High blood pressure is therefore an important risk factor for cardiovascular mortality and morbidity. As the main excretory organ, the kidney excretes water and sodium and thereby controls the water content of the body and the sodium concentration in the blood. In the end, these two factors have the biggest impact on blood pressure. The channel responsible for the reabsorption of Na^+ is called epithelial sodium channel (ENaC). The most important factor influencing the activity of the ion channel is the hormone aldosterone. In addition, channel proteolytic cleavage, shear stress, vasopressin, channel palmitoylation, Na^+ self-inhibition, and the circadian clock, which affect the channel's operation and thus the Na^+ current, are crucial for the regulation of the channel. Mutations on the channel can cause diseases. Functional enhancement by channel gain-of-function mutations is referred to as Liddle syndrome and attenuated function by loss-of-function mutations of the channel as pseudohypoaldosteronism type 1. Symptoms of Liddle syndrome include early onset hypertension associated with hypokalemia, metabolic alkalosis, and low renin and aldosterone activity. In contrast, the systemic form of pseudohypoaldosteronism involves dehydration, hyponatraemia, hyperkalaemia, and hypotension. From this form of pseudohypoaldosteronism there are two other forms to be distinguished, the renal and secondary form.

Inhalt

1. Einleitung.....	7
1.1. Blutdruckregulation	7
1.2 Hypo- und Hypertonie als Risikofaktor	7
2. Funktion und Struktur von ENaC.....	9
3. Faktoren, die die ENaC Funktion beeinflussen	12
3.1. Einfluss von Aldosteron.....	12
3.2. Einfluss von Proteolyse	17
3.3. Einfluss von <i>laminar shear stress</i>	19
3.4. Einfluss von Vasopressin, Kanal-Palmitoylierung, <i>Na⁺ self inhibition</i> und circadianer Uhr	21
4. Mutationen von ENaC mit Einfluss auf den Blutdruck.....	23
4.1. <i>Gain-of-function</i> Mutationen (Liddle Syndrom).....	23
4.2. <i>Loss-of-function</i> Mutationen (Pseudohypoaldosteronismus)	24
5. Referenzen	33

1. EINLEITUNG

1.1. Blutdruckregulation

Der Blutdruck hängt unter anderem von der Menge an Körperwasser und der Konzentration der Elektrolyte wie Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- ab. 60-70% des Gewichtes des Körpers ist Wasser, wobei sich 2/3 von diesem Wasser in den Zellen befinden und der Rest im extrazellulären Raum. Die Zellmembran ist permeabel für Wassermoleküle und die Bewegung zwischen intra- und extrazellulärem Raum hängt von den osmolaren Verhältnissen ab. Elektrolyte bestimmen die Osmolarität und Na^+ hat die höchste Konzentration extrazellulär, also hat es den größten Einfluss auf die Osmolarität. Die Na^+ -Konzentration im Blut hat also einen großen Einfluss auf den Blutdruck. Absorption, Exkretion und Sekretion von Wasser erfolgt in den epithelialen Zellschichten, die die internen und externen Oberflächen des Körpers auskleiden. Epithelzellen befinden sich im distalen Dickdarm und distalen Nephron, in den Atemwegen, Schweißdrüsen und Speicheldrüsen.

Viele verschiedene Parameter regulieren den Blutdruck, darunter das Herzzeitvolumen, das Blutvolumen, der arterielle Tonus, das Renin-Angiotensin-Aldosteron System, natriuretische Peptide, das Endothel, das sympathische Nervensystem und das Immunsystem. Störungen dieser Faktoren können Änderungen des Blutdruck verursachen (siehe Oparil et al, 2018).

Nieren sind die wichtigsten Ausscheidungsorgane; sie sind für den Wasser- und Elektrolythaushalt verantwortlich und regulieren dadurch den Blutdruck, weil in den Tubuli sowohl Wasser- als auch Natrium-Ionen resorbiert werden. Hier wirken auch die wichtigsten blutdruckregulatorischen Hormone, Aldosteron und Vasopressin (Taschenatlas der Pathophysiologie, 2005). Hier befindet sich ENaC, der epitheliale Natriumkanal (epithelial sodium channel), welcher für das Feintuning der Na^+ -Konzentration im Blut verantwortlich ist (Stokes, 1999).

1.2. Hypo- und Hypertonie als Risikofaktoren

Die Blutdruckregulation ist sehr wichtig im Körper, weil Hypertonie als Risikofaktor für verschiedene Erkrankungen wie ischämischer und hämorrhagischer Schlaganfall, Myokardinfarkt, koronare Herzkrankheit, Niereninsuffizienz oder Herzinsuffizienz gilt. Die *Global Burden Disease Study* rechnet hoch, dass global gesehen die Menschen pro Jahr 212 Millionen gesunde Jahren wegen eines nicht optimalen Blutdrucks verlieren. Für den

Zeitraum zwischen 1990 und 2015 bedeutet das eine Erhöhung um 43% (siehe Oparil et al, 2018). Weiters wird angenommen, dass 54% der Schlaganfälle und 47% der ischämischen Myokardinfarkte direkt durch hohen Blutdruck verursacht werden. Zu hoher Blutdruck ist also ein wichtiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität. Die Therapie erfolgt durch Antihypertensiva, der Blutdruck ist aber oft nicht ideal eingestellt wegen mangelnder Kontrolle, Fehlen einer optimalen Versorgung oder mangelndem Vertrauen von der Seiten der Patienten in die Therapie (World Health Organisation, 2002, United States Renal Data System, 1999).

Es gibt eine primäre und sekundäre Form der Hypertonie. Die primäre Hypertonie hat einen genetischen Hintergrund; meistens sind mehrere Gene und Umweltfaktoren zusammen dafür verantwortlich, es hat also einen polygenetischen Charakter. Unter Umweltfaktoren fallen auch Erkrankungen wie Diabetes oder Adipositas, aber auch hoher Salz- oder Alkoholkonsum, körperliche Inaktivität und niedriger Kaliumkonsum gehören zu diesen Faktoren. Eine Minderheit von primären Hypertonien ist durch ein einziges Gen verursacht; es sind monogenetische Erkrankungen. Bei diesen Hypertonieformen spielen Veränderungen in den molekularen Signalwegen eine Rolle (Harrap et al, 2000, Pickering, 1955, Lifton, 1996).

Ursachen der sekundären Hypertonie sind andere Erkrankungen; die häufigsten sind renale Arterienstenose, Hyperaldosteronismus, Cushing-Syndrom oder Phäochromozytom. In diesen Fällen muss die Ursache beseitigt werden. Erhöhter Blutdruck ist manchmal mit erhöhtem Herzzeitvolumen und erhöhtem peripheren vaskulären Widerstand verbunden. Meistens begleiten Hypertonie noch andere Risikofaktoren wie männliches Geschlecht, Rauchen, Dyslipidämie, Diabetes, Adipositas, Tachykardie oder falscher Lebensstil (siehe Jordan et al, 2018).

Hypotonie ist nicht so gefährlich wie Hypertonie. Es existieren mehrere Formen wie z.B. die orthostatische Hypotonie, die vor allem bei älteren Patienten vorkommt. Eine orthostatische Hypotonie liegt vor, wenn der Blutdruck nach 3 Minuten Stehen um mehr als 20 mmHg systolisch oder mehr als 10 mmHg diastolisch abfällt. Im gesunden Organismus treten Kontrollmechanismen in Kraft, um dem Absacken des Blutdruckes im Stehen entgegen zu wirken, aber manche Erkrankungen und Medikamente wie zum Beispiel Antihypertensiva und bestimmte Antidiabetika können dies verhindern. Das führte zur Annahme, dass Hypotonie meistens mit anderen Erkrankungen in Verbindung steht, wie zum Beispiel

neurologischen oder kardiovaskulären Problemen. Eine Form von orthostatischer Hypotonie ist die neurogene Form. Bei dieser leiden die Patienten unter Schwindel, Kopfschmerz, Nausea, Schwäche und Zittern. Mehr Wasser- und Natriumkonsum hilft die Symptome zu bekämpfen. Weiters gibt es auch eine postprandiale und aktivitätsbedingte Hypotonie. Bei der postprandialen Hypotonie hilft die Aufnahme kleinerer Mahlzeiten (siehe Eschlböck et al, 2017).

2. FUNKTION UND STRUKTUR VON ENaC

Als wichtigstes Ausscheidungsorgan scheidet die Niere Wasser und Natrium aus und kontrolliert dadurch den Wassergehalt des Körpers und die Natriumkonzentration im Blut. Im Endeffekt haben diese beiden Faktoren die größte Wirkung auf den Blutdruck (Taschenatlas der Pathophysiologie, 2. korrigierte Auflage, 2005).

Die Ionenausscheidung in der Niere erfolgt über Ionenkanäle. Der Kanal, der für die Rückresorption von Na^+ verantwortlich ist, wird als epithelialer Natriumkanal (ENaC, *epithelial sodium channel*) bezeichnet. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Natrium-Flusses in polarisierten Epithelien ist der ENaC-vermittelte Ionenfluss. Dadurch hat ENaC einen zentralen Effekt auf Blutvolumen und Blutdruckregulation (Rossier and Palmer, 1992).

Der Na^+ -Fluss wird reguliert durch die Na^+/K^+ -Pumpe, die sich auf der basolateralen Seite befindet und durch ENaC, der auf der luminalen Seite ist. Über ENaC gelangt Na^+ an der luminalen Seite in die Zelle und wird von der Na^+/K^+ -Pumpe an der basolateralen Seite aus der Zelle hinausgepumpt. So gelangt Na^+ in die interstitielle Flüssigkeit (Schild et al, 1997; Rossier and Palmer, 1992).

ENaC gehört zu den Na^+ - und Amilorid-selektiven, spannungsunabhängigen Ionenkanälen der ENaC/Degenerin Superfamilie. ENaC befindet sich an der apikalen Seite der Epithelgewebe mehrerer Organe wie distales Nephron, distales Colon, Speichel- und Schweißdrüsen sowie Atemwege (Rossier and Palmer, 1992).

In der Lunge reguliert ENaC die Flüssigkeitshomöostase. Wenn Na^+ über ENaC in die Zelle fließt, folgt Wasser nach dem osmotischen Gradienten. Damit wird Wasser in den interstitiellen Raum extrudiert. Wenn dieser Vorgang gestört abläuft, dann können schwerwiegende Ödemen auftreten (McDonald et al, 1994).

ENaC ist ein Heterotrimer, welches aus α -, β - und γ -Untereinheiten besteht, mit einer stöchiometrischen Verteilung von 1:1:1. Die Untereinheiten stehen entgegen dem Uhrzeigersinn (Canessa et al, 1993). Neben diesen drei Untereinheiten existiert noch eine vierte, die so genannte δ -Untereinheit. Diese kann ebenfalls mit β - und γ -Untereinheiten Kanäle bilden. δ -ENaC kommt in Gehirn, Plazenta, Herz, Pankreas, Hoden und Eierstock vor und zu einem geringen Anteil auch in Niere und Lunge (Waldmann et al, 1995).

Die ENaC Untereinheiten haben 30-50% Sequenzidentität (Canessa et al, 1993). Kanäle müssen immer die Membran durchdringen und haben dadurch einen extrazellulären und einen intrazellulären Teil. Die extrazelluläre Domäne ist mehrmals glykosyliert, wobei die β -Untereinheit elf Glykosylierungsstellen hat, und somit mehr als die α - und γ -Untereinheit. Oligosaccharide können an N4 des Asparaginrests gebunden sein. Glykosylierung erfolgt am Anfang einer Konsensussequenz; diese besteht aus drei Aminosäuren: Asn-Xaa-Ser / Thr (Canessa et al., 1994; Snyder et al., 1994). Die Struktur der extrazellulären Domäne wird durch acht Disulfidbrücken in der α - und γ -Untereinheit stabilisiert und durch neun in der β -Untereinheit (Firsov et al, 1999).

Der extrazelluläre Teil ähnelt einer Hand. Die einzelnen Regionen schauen wie Handfläche, Fingerknöchel, Finger, Daumen und β -Kugel aus. „Finger“ und „Fingerknöchel“ bilden einen ‚Kragen‘ am oberen Teil der extrazellulären Domäne. Die „-Kugel-“, „Finger-“ und „Daumen“-Domäne einer Untereinheit und die „Handflächen“-Domäne bilden eine aromatische Tasche, die beim Kanalschaltverhalten (*Gating*) des epithelialen Natriumkanals eine wichtige Rolle spielt (Abbildung 1 und 2). Diese Anordnung wird als aromatische Tasche bezeichnet, weil sie mit vielen aromatischen Resten wie Tyrosin eingebettet ist. Weitere wichtige regulatorische Regionen oder „*gating domains*“ sind die so genannte „Finger-“ und „Daumen“-Domäne. Zwischen diesen beiden Regionen befindet sich die Protease-sensitive hemmende Domäne, die die Konfigurationsveränderungen der „Finger-“ und „Daumen“-Domäne reguliert. Diese Region wird als GRIP-Domäne (*Gating Relief of Inhibition by Proteolysis*) bezeichnet (Noreng et al, 2018).

„Handfläche“ und „ β -Kugel“ bestehen aus β -Strängen und -Schleifen, die nicht miteinander zusammenhängen. Diese Domänen sind in unmittelbarer Nähe der Membran. „Daumen“, „Fingerknöchel“ und „Finger“ befinden sich hingegen in der Peripherie. Sie bestehen aus zusammenhängenden α -Helices und Schleifen. Die „Handfläche“ kann in zwei Teile unterteilt werden, die obere und die untere „Handfläche“. Die untere „Handfläche“ ist direkt an

Transmembrandomäne 1 gebunden; diese Region wird als „Handgelenk“ bezeichnet (Noreng et al, 2018).

ENaC hat zwei Transmembrandomänen, TM1 und TM2. Sie haben eine helixartige Struktur und bilden die Pore, welche für Na^+ und Li^+ über K^+ selektiv ist (Snyder et al, 1999). Vor TM1 befinden sich zwei bis drei konservierte Lysin- oder Arginin-Reste. Solche positiv geladene Reste interagieren mit den hydrophilen Köpfen der Membranlipide und helfen bei der Verankerung des Kanals. Deshalb befinden sich mehrere Lysin- und Arginin-Reste auf der zytoplasmatischen Seite der TM1. Diese Verteilung wird als ‚positive-inside‘ bezeichnet (von Heijne, 1992). In TM2 befindet sich der Selektivitätsfilter, welcher aus einem G/S-X-S Motiv besteht (Snyder et al, 1999; Kellenberger et al, 1999). Außerdem befindet sich die Amilorid-Bindungsstelle auch in diesem Bereich. Charakteristisch für ENaC ist der rasche Block durch Amilorid (Kleyman and Cragoe, 1988). Dieser Bereich beinhaltet bei der α -Untereinheit ein Serin und bei der β - und γ -Untereinheit ein Glycin. Nach der TM2 ist wieder die ‚positive-inside‘ Regel im Einsatz. In diesem Bereich befinden sich wieder Lysin und Arginin-reiche Reste, die die gleiche Aufgabe haben wie bei TM1, also Reaktion mit hydrophilen Köpfen der Membranlipide um damit die Verankerung von ENaC in der Membran zu verstärken (von Heijne, 1992).

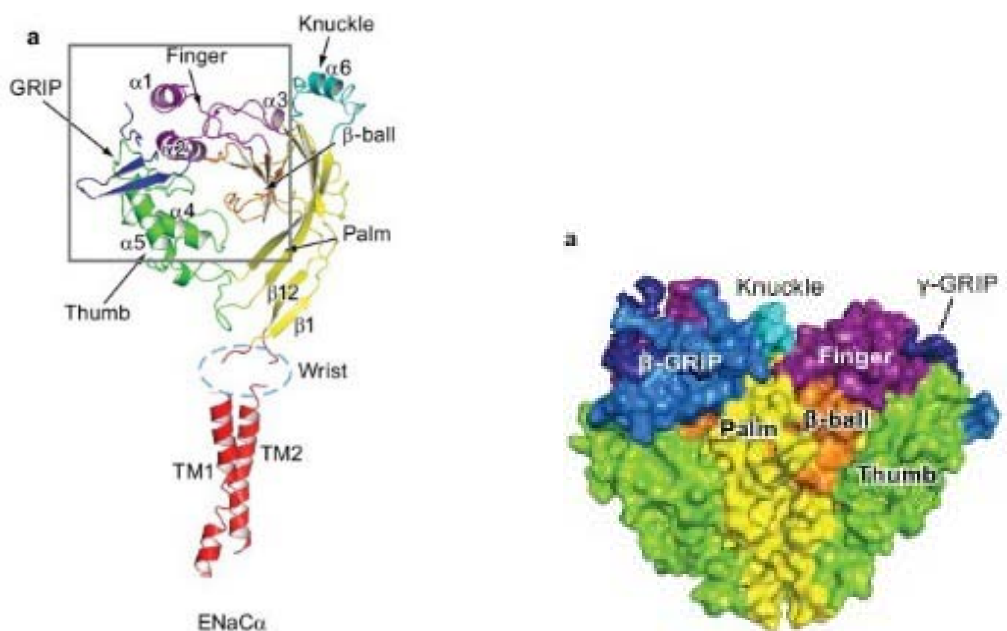


Abbildung 1: Alle Domänen sind auf dieser Abbildung dargestellt, sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Teile. Die Lage der Domänen ist gut sichtbar.

Abbildung 2: Alle extrazellulären Domänen sind gut sichtbar und die Anordnung von diesen Domänen ist dargestellt.
(Noreng et al, 2018)

ENaC hat kurze zytoplasmatische N- und C-Termini (Canessa et al, 1993). Der C-Terminus ist eine wichtige Interaktionsstelle mit Proteinen, Signaltransduktionsmolekülen und Ionen, die bei der Regulation der ENaC-Aktivität eine Rolle spielen. Der C-Terminus kann während des Transports zur Zellmembran über das Trans-Golgi-Netzwerk mit Zytoskelettelementen interagieren. Mikrotubuli, Aktinfilamente und assoziierte Proteine bilden einen wesentlichen Teil des komplexen Netzwerks von Proteinen, die am intrazellulären Transport von Proteinen beteiligt sind (Cantiello et al, 1991).

Ein hochkonservierter Bereich des C-Terminus ist das PY-Motiv. Die Konsensussequenz für das PY-Motiv ist PPPXYXXL. Es ist eine prolinreiche Region und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der ENaC-Aktivität (Schild et al, 1996).

3. FAKTOREN, DIE DIE ENaC-AKTIVITÄT BEEINFLUSSEN

Die ENaC-Funktion hängt von der Anzahl der Kanäle in der Membran und auch von der Öffnungswahrscheinlichkeit der einzelnen Kanäle ab. Die Öffnungswahrscheinlichkeit wird durch proteolytische Prozesse reguliert. Die Anzahl der Kanäle, welche in die Membran eingebaut werden, wird von mehreren Faktoren beeinflusst.

3.1. Einfluss von Aldosteron

Der wichtigste Faktor, der die Internalisierung des Ionenkanals beeinflusst, ist das Hormon Aldosteron (Abbildung 3). Aldosteron ist Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Wenn der Blutdruck oder Na^+ -Spiegel sinkt, wird Renin freigesetzt und es wird eine Kaskade ausgelöst. Renin ist eine Aspartylprotease und macht die Bildung von Angiotensin II möglich, welches ein direktes Sekretagog für Aldosteron ist. Im Endeffekt wird Aldosteron aus der Nebennierenrinde freigesetzt (Davis et al, 1961; Davis et al, 1962). Es ist ein Steroidhormon (Wettstein et al, 1954) und zu seinen Aufgaben gehört die Regulation des Blutdrucks und des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens. Dies wird durch eine erhöhte Natriumresorption und erhöhte Exkretion von Kalium erreicht (Dee U. Silverthorn: Physiologie, 2009). Die Aldosteronsekretion kann man auch durch Nahrung stimulieren oder einschränken. Durch eine Einschränkung der Salzaufnahme über die Nahrung wird die Aldosteronwirkung hochreguliert und durch eine hohe Salzaufnahme wird sie unterdrückt. Daraus folgt, dass die ENaC-Aktivität unter diätetischer Salzbeschränkung hochreguliert und bei einer salzreichen Diät herunterreguliert wird (Mironova et al, 2012).

Die Wirkung auf die Ionenhomöostase entfaltet sich im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron, das aus dem distalen Tubulus und aus dem Sammelrohr besteht. Außerdem existieren noch weitere Gewebe, die Mineralokortikoidrezeptoren exprimieren; sie sind im distalen Dickdarm und am Ductus exokriner Drüsen zu finden (Funder and Edelman, 1972). Sie werden allerdings nicht nur durch Aldosteron aktiviert, sondern auch durch Cortisol, Corticosteron, Desoxycorticosteron und Progesteron. Deshalb sind die Rezeptoren in der Niere durch das 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Enzym geschützt. Dieses Enzym wandelt Cortisol in Cortison um und Cortison aktiviert nicht den Rezeptor (Edwards et al, 1988; Funder et al, 1988).

Der Mineralokortikoidrezeptor gehört zu den Steroidhormonrezeptoren und er besteht aus 984 Aminosäuren. Er hat drei Domänen: Die N-terminale Domäne, eine DNA-Bindungsdomäne und eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne. Die N-terminale Domäne hat eine autonome Aktivierungsfunktion. Sie ist konstitutiv aktiv und interagiert mit Co-Aktivatoren, Co-Repressoren und mit der Ligandenbindungsdomäne. In der DNA-Bindungsdomäne sind zwei Zinkfinger-Strukturen vorhanden. Sie sind für die DNA-Bindung und Rezeptordimerisierung nötig. In jedem Zinkfinger befinden sich vier Cysteine, die ein Zinkion binden können. Die Ligandenbindungsdomäne hat eine ligandenabhängige Aktivierungsfunktion, ist aber auch für die Rezeptordimerisierung und Translokation in den Zellkern wichtig (Arriza et al, 1987).

Der Mineralokortikoidrezeptor ist ein intrazellulärer Rezeptor; daher muss Aldosteron in die Zelle eindringen. Dort bindet es an seinen Rezeptor und die Translokation in den Zellkern findet statt. Dort reguliert dieser Komplex die Expression von Proteinen wie den ENaC, die Na⁺/K⁺-ATPase und den ROMK (renaler äußerer medullärer K⁺-Kanal) (Porter et al, 1964).

Aldosteron stimuliert den Na⁺-Transport in zwei Phasen. Die frühe Phase erfolgt innerhalb der ersten 2,5 Stunden und die späte Phase beginnt erst ab 2,5 Stunden. Die Gene der frühen Phase sind für die Initiierung der Antwort verantwortlich; sie kodieren Gene der Iontentransportmaschinerie, wie ENaC Untereinheiten oder die Na⁺/K⁺-ATPase oder Signalmoleküle, die die Funktion des ENaC steuern. Gene der späten Phase hingegen nehmen an der Konsolidierung teil (siehe Verrey, 1999). Sie kodieren regulatorische Proteine, die die Aldosteronantwort begrenzen. Dazu gehören Aktivatoren der MAPK-Kaskade, einschließlich des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor (Grossman et al, 2004).

Von den Aldosteron-regulierten Genen ist das Gen für die SGK1 (Serum- und Glucocorticoid-induzierte Kinase-1), welche eine Serin/Threonin-Kinase ist, am besten charakterisiert (Náray-Fejes-Tóth et al, 1999; Sei-yu Chen et al, 1999). SGK1 wird erst nach zwei Phosphorylierungen aktiviert, zuerst durch mTOR (*mammalian target of rapamycin*), und zweitens durch PDK1 (PI3K-abhängige Kinase-1) (Kobayashi and Cohen, 1999; Park et al., 1999). Die stimulierende Wirkung auf ENaC kann in drei Gruppen unterteilt werden, die erste Gruppe ist die posttranslationale Wirkung auf Nedd4-1 und Nedd4-2, die zweite Gruppe ist die posttranslationale, aber Nedd4-1 und Nedd4-2 unabhängige Wirkung, und die dritte Gruppe ist die Transkription von Genen.

Nedd4-1 und Nedd4-2 (*neuronal precursor cell expressed developmentally down-regulated gene 4*) sind Ubiquitin Ligase Enzyme. Nedd4-1 hat eine schwächere Wirkung als Nedd4-2, aber beide beinhalten WW Domänen, die mit dem PY-Motiv von ENaC interagieren (Abbildung 3). Der Name der WW Domäne weist auf die zwei Tryptophane hin, die sich in dieser Domäne befinden. W steht für den Code der Aminosäure Tryptophan. Diese Domäne hilft bei der Kanalubiquitinierung und verringert dadurch die Oberflächenexpression des Kanals, was natürlich den Natriumstrom verringert. Die Ubiquitylierung, also die kovalente Bindung von Ubiquitin-Polypeptiden an Zielproteine von Plasmamembranproteinen, ist ein Zeichen für Endozytose und den lysosomalen Abbau des Kanals (Staub et al, 1996; Kanelis et al, 1998, 2001). SGK1 phosphoryliert Nedd4 und das führt zu einer Wechselwirkung zwischen Nedd4 und spezifischen, Aldosteron-induzierten 14-3-3-Protein-Isoformen. Das alles führt zu einer Abnahme der Affinität von Nedd4 Enzymen zu ENaC, und schließlich kommt es zu einer erhöhten Retention von Kanälen an der apikalen Membran (Bhalla et al, 2005; Ichmura et al, 2005).

Ein Kanalabbau kann auch durch desubiquitinierende Enzyme verhindert werden. Eines davon ist das Ubiquitin-spezifische Protein 2-45 (Usp2-45). Seine Aktivität wird auch durch Aldosteron erhöht und dementsprechend wird die ENaC-Aktivität, Oberflächenexpression und die proteolytische Spaltung von α - und γ -ENaC-Untereinheiten erhöht (Fakitsas et al, 2007; Ruffieux-Daidié et al, 2008).

SGK1 kann ENaC auch unabhängig von Nedd4-1 und Nedd4-2 ENaC aktivieren. Als erstes wird ein Serinrest im intrazellulären C-terminalen Ende von α -ENaC direkt phosphoryliert, wodurch Kanäle an der Zelloberfläche direkt aktiviert werden (Diakov and Korbmacher, 2004). Ein anderer Nedd4-2 unabhängiger Mechanismus ist die Phosphorylierung von WNK4

(with no lysin 4). WNK4 ist eine Serin/Threonin Kinase und sie ist wichtig für das Gleichgewicht von NaCl-Reabsorption und K^+ Sekretion (Veríssimo and Jordan, 2001). Sie inhibiert hinsichtlich Blutdruckregulation wichtige Kanäle, wie unter anderen auch ENaC (Kahle et al, 2003). SGK1 aktiviert auch die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase und dadurch auch ENaC. Je intensiver die Pumpe funktioniert, desto mehr Na^+ gelangt in das Interstitium. Das alles resultiert in einer erhöhten Na^+ -Resorption durch ENaC (Alvarez de la Rosa et al, 2006). Zur dritten Kategorie gehören die durch SGK1 regulierten Gentranskriptionen, also die Hochregulierung von Bauteilen der Na^+ -Transportmaschinerie. SGK1 reguliert die Expression von späten Aldosteron-responsiven Genen, hauptsächlich für α -ENaC (Boyd and Náray-Fejes-Tóth, 2005). Aber SGK1 hemmt auch den Dot1a- (Unterbrecher der Telomer-Silencing-Variante 1a)-Af9 (ALL1-fusioniertes Gen aus Chromosom 9)-Komplex. Dieser Komplex ist ein transkriptionelles Repressionselement für die ENaC-Transkription. SGK1 phosphoryliert Af9 und reduziert die Wechselwirkung zwischen Dot1a und Af9. Dadurch wird die Transkription von ENaC möglich (Zhang et al, 2007).

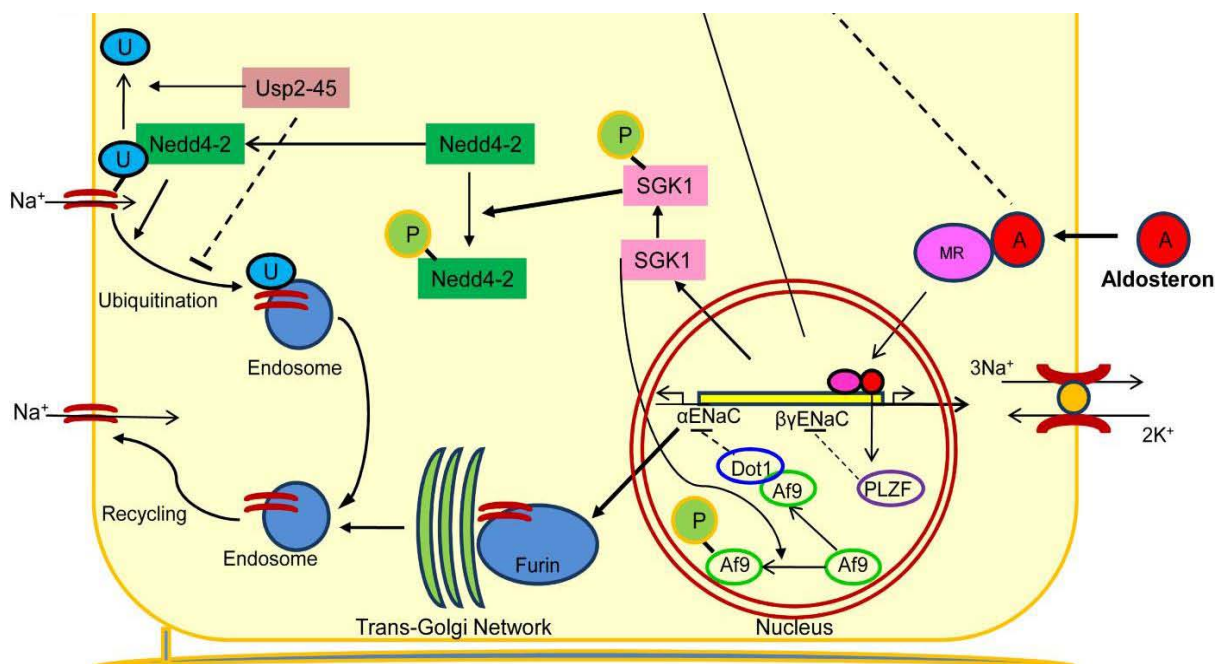


Abbildung 3: Aldosteron reguliert die ENaC Aktivität:

Aldosteron bindet an den Mineralokortikoidrezeptor und erhöht die Transkription von Genen. SGK1 ist eines dieser Gene; es wird phosphoryliert und hemmt dann die Kanalubiquitinierung von Nedd4-2. Dadurch wird die ENaC Aktivität erhöht.

SGK1 hemmt den Dot1-Af9-Komplex. Dieser Komplex hat eine hemmende Wirkung auf ENaC, d.h. durch die Hemmung des Komplexes wird ENaC aktiviert.

Usp2-45 ist ein desubiquitinierendes Enzym. Seine Aufgabe ist die Desubiquitinierung von ENaC und kann dadurch seinen endosomalen Abbau hemmen.

Aldosteron erhöht die Translation von Genen für die Na^+/K^+ -Pumpe. Wenn die basolaterale Na^+/K^+ -Pumpe intensiver arbeitet, gelangt mehr Na^+ ins Interstitium und ENaC muss mehr resorbieren (Hamm et al, 2010).

Neben SGK1 stimuliert Aldosteron die Expression einer Reihe anderer regulatorischer Proteine (Abbildung 4). Eines davon ist GILZ1 (*glucocorticoid-induced leucine zipper protein 1*), welches ein kleines Chaperon-Protein ist (Muller et al, 2003). Der Raf-MEK-ERK1/2 MAPK-Signalweg hemmt die ENaC-Aktivität (Vehaskari et al, 1989). ERK2 kann Threonine an die β - und γ -Einheit phosphorylieren. β -Thr613 und γ -Thr623 grenzen an das PY-Motiv und dadurch können sie die Wechselwirkung zwischen ENaC und Nedd4-2 erleichtern und die Kanalenendozytose fördern (Shi et al, 2002). GILZ1 stört MAP-Signalwege und dadurch erhöht es die Membranexpression von ENaC. GILZ1 interagiert mit Raf1 und hemmt seine Aktivität. Raf1 aktiviert normalerweise nach einigen Passagen ERK1 und ERK2. Wenn also die Raf1-Aktivität gehemmt wird, wird auch die ERK2-Aktivität gehemmt und somit auch seine hemmende Wirkung auf ENaC. Schließlich wirkt GILZ1 aktivierend auf den Natriumstrom (Ayroldi et al, 2002). GILZ1 interagiert auch mit Nedd4-2 und SGK1 innerhalb eines ENaC-Regulierungskomplexes (ERC), der durch GILZ1 reguliert ist. In Abwesenheit von Aldosteron bleiben GILZ1- und SGK1-Spiegel niedrig und der Komplex besteht nur aus Nedd4-2 und Raf-1 sowie anderen Komponenten des Raf-MEK-ERK-Signalwegs, von denen bekannt ist, dass sie eng mit Raf-1 assoziiert sind. Bei Anwesenheit von Aldosteron rekrutiert GILZ1 SGK1 in den Komplex. Zusammen hemmen sie Nedd4-2 und Raf-1 und stimulieren synergistisch die Expression und Aktivität von ENaC (Soundararajan et al, 2009).

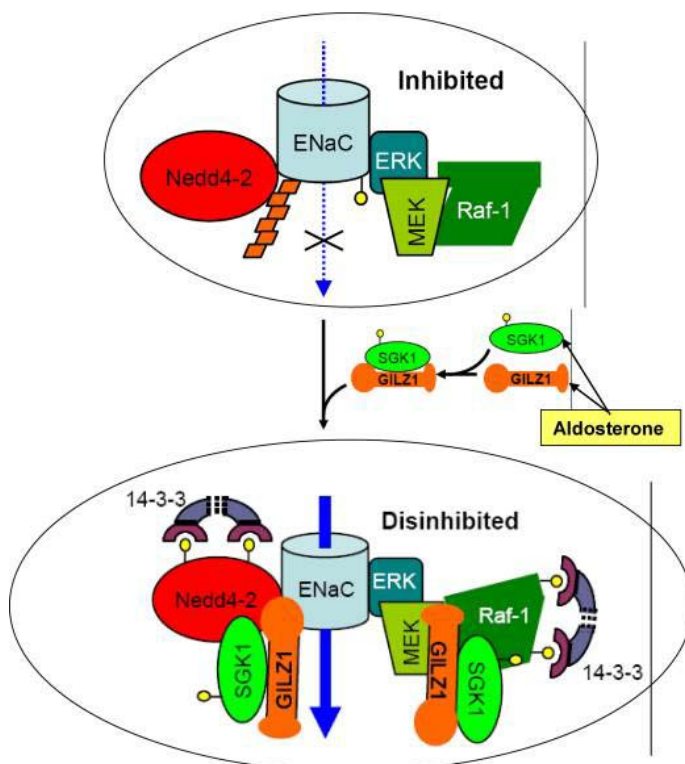


Abbildung 4: Aldosteron reguliert die ENaC-Aktivität:

Bei Abwesenheit von Aldosteron besteht der ERC nur aus Nedd4-2 und Bestandteilen des Raf-MEK-ERK-Signalwegs. Dieser Komplex hemmt ENaC.

Bei Anwesenheit von Aldosteron wird der SGK1- und GILZ1-Spiegel hochreguliert und GILZ1 rekrutiert SGK1 in den Komplex. Zusammen hemmen sie Nedd4-2 und Raf-1 und stimulieren synergistisch die Expression und Aktivität von ENaC. (Soundararajan et al, 2010)

3.2. Einfluss von Proteolyse auf die Aktivität von ENaC

Die proteolytische Spaltung spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von ENaC durch Spaltung an bestimmten Stellen innerhalb der Fingerdomänen der α - und γ -Untereinheiten (Orce et al, 1980; Hughey et al, 2003) (Abbildung 5). Die proteolytische Spaltung erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals und erhöht dadurch den Natriumstrom (Caldwell et al, 2004, 2005). Die ENaC-Verweilzeit in der Plasmamembran beeinflusst das Ausmaß der Spaltung von α - und γ -Untereinheiten. Längere Verweilzeiten waren mit einem höheren Grad an Proteolyse der Untereinheiten verbunden. Mehrere Faktoren, einschließlich Aldosteron-abhängiger Signalprozesse, verlängern die ENaC-Verweilzeit an der Plasmamembran (Kabra et al, 2008). Na^+ -Eintrittsraten oder Änderungen der intrazellulären Na^+ -Konzentration beeinflussen die proteolytische Verarbeitung der α - und γ -Untereinheiten. Eine verringerte Na^+ -Eintrittsraten führte zu einer verstärkten Spaltung von Kanaluntereinheiten (Knight et al, 2008).

Furin gehört zur Familie der Proproteinkonvertasen von Serinproteasen, die sich hauptsächlich im trans-Golgi-Netzwerk befinden und Substrate unmittelbar nach der minimalen Konsensussequenz von Arg-X-X-Arg spalten, wobei X ein beliebiger Rest ist (Molloy et al, 1992, 1994). Furin spaltet die α -Untereinheit zweimal, im Gegensatz dazu spaltet Furin die γ -Untereinheit an einer einzelnen Stelle. Die furinabhängige Proteolyse der α -Untereinheit aktiviert ENaC, indem sie eine inhibitorische Domäne, die sich in Position α -Asp-206-Arg-231 befindet, vom Kanalkomplex abspaltet (Carattino et al, 2006). Die Spaltung von α - und γ -Untereinheiten durch Furin erfolgt während des Zusammenbaus der Kanäle und der Abgabe an die Zellmembran, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Dies führt dazu, dass Kanäle mit einer Reihe von proteolytischen Aktivierungen an die Oberfläche gelangen. Ungespaltene oder möglicherweise gemischte Multimere von gespaltenen und ungespaltenen Untereinheiten sind für eine weitere Spaltung und Stimulierung durch Oberflächen- oder lösliche Proteasen anfällig (Hughey et al, 2004).

Im Gegensatz zu Furin aktivieren CAPs (*channel-activating proteases*) ENaC an der Zelloberfläche. Sie sind oberflächengebundene Proteasen (Bruns et al, 2007). Protsasin (oder CAP1) ist eine Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Serinprotease, die auf der Oberfläche von Nieren- und Atemwegsepithelien lokalisiert ist (Vallett et al, 1997). Die Protsasin-induzierte Spaltung der γ -Untereinheit findet an einer definierten Stelle statt, welche distal zur zuvor identifizierten Furin-Spaltungsstelle liegt. Die Spaltung der γ -Untereinheit durch

Furin und Prostatin setzt einen 43-Reste-Trakt frei, der zu einer Erhöhung der ENaC-Aktivität führt (Bruns et al, 2007). Andere Proteasen aktivieren ENaC auch durch Spaltung der γ -Untereinheit an Stellen distal von der Furinstelle; dies sind Elastase, CAP2 und CAP3 (Matripase), jedoch wird die α -Untereinheit nicht durch CAPs gespalten (Harris et al, 2007; Vuagniaux et al, 2002). Die Expression von Prostatin wird durch Aldosteron hochreguliert (Narikiyo et al, 2002).

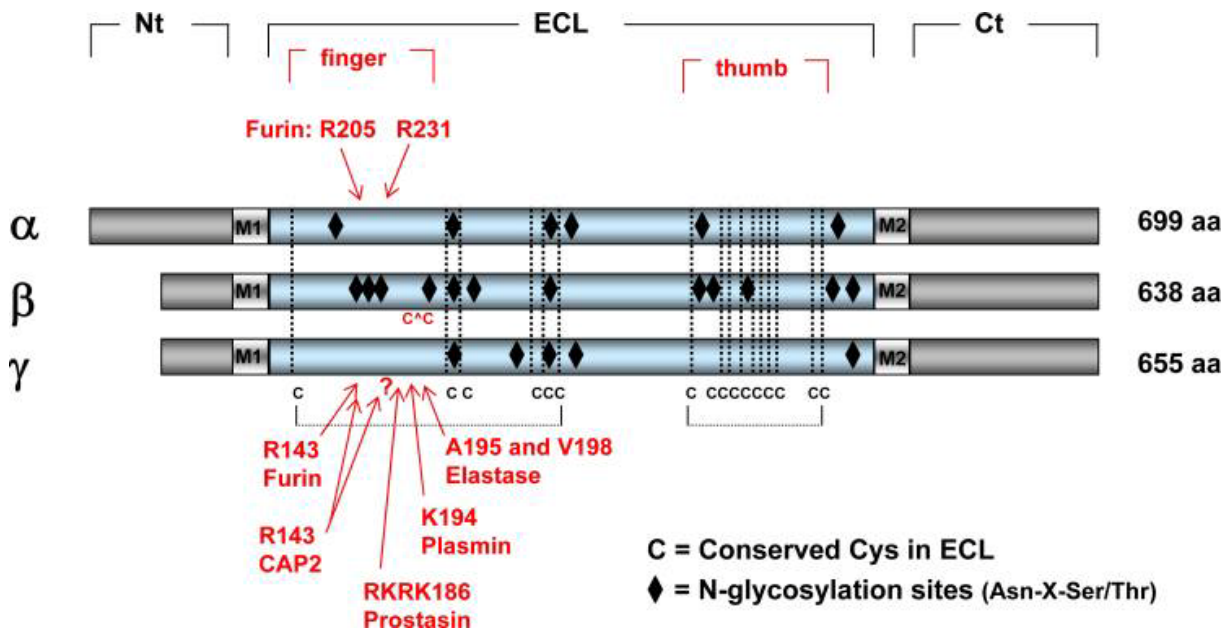


Abbildung 5: Lineare Modelle der ENaC-Untereinheiten:

N-Terminus, Transmembrandomänen (M1 und M2), extrazellulärer Loop und C-Terminus sind abgebildet. Im extrazellulären Loop der α -Untereinheit, genauer in der Finger-Domäne sind die zwei Furinschnittstellen dargestellt.

In der γ -Untereinheit sind die einzelne Furinschnittstelle und die zahlreichen anderen Stellen, die durch andere Proteasen wie Prostatin, CAP2, Elastasen und Plasmin geschnitten werden, gekennzeichnet.

In der β -Untereinheit ist noch eine zusätzliche Glykosylierungsstelle und eine zusätzliches Cystein-Paar zu sehen. Das ist der Grund für die Abwesenheit einer Proteolyse.

(Kleyman et al, 2009)

Die Spaltung der γ -Untereinheit spielt eine dominante Rolle bei der Aktivierung von ENaC. Prostatin ist in der Lage ENaC zu aktivieren, wenn die Furinschnittstelle in der α -Untereinheit mutiert ist, wohingegen die Aktivierung von ENaC durch Prostatin durch die Mutation der Furin- und Prostatinschnittstellen in der γ -Untereinheit blockiert wird. Die Deletion des

Inhibitor-Trakts der γ -Untereinheit aktiviert ENaC trotz der Mutation der Furinschnittstellen in der α -Untereinheit oder der Anwesenheit des Inhibitor-Trakts der α -Untereinheit vollständig. Das erfordert, dass die Spaltung der γ -Untereinheit für die ENaC-Aktivierung wichtiger ist als die Spaltung der α -Untereinheit (Carattino et al, 2008).

Endogene Inhibitoren von Serinproteasen reduzieren den Na^+ -Transport. Das wichtigste Beispiel ist ein Inhibitor von Prostatin. Protease Nexin 1 (PN-1) gehört zu der Serpin-Familie und hemmt nicht nur Prostatin sondern auch α -Trombin, Plasminogen und Plasmin-Aktivatoren. Prostatin und PN-1 werden durch Aldosteron und TGF- β reziprok reguliert. Aldosteron erhöht den Prostatin-Spiegel und erniedrigt PN-1, fördert also die ENaC-Aktivierung, aber TGF- β erniedrigt den Prostatin-Spiegel und erhöht PN-1 (Wakida et al, 2006).

3.3. Einfluss von *Laminar shear stress*

Ionenkanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung mechanischer Reize wie Scherspannung und sind beteiligt an der Aktivierung zellulärer Signalwege, die wiederum die Zelleigenschaften verändern. Scherbeanspruchung ist die Reibungskraft des Flüssigkeitsflusses an der Oberfläche von Zellen. Scherbeanspruchung die erzeugt wird, wenn das Herz das Blut durch den systemischen Kreislauf pumpt, spielt eine Schlüsselrolle bei der Funktion von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen (le Noble et al, 2004; North et al, 2009). Solche Ionenkanäle befinden sich zum Beispiel in Endothelzellen, die Blutgefäße auskleiden, und in Epithelzellen, die Harnwege und Atemwege auskleiden. Für die Blutdruckregulation sind jene wichtig, die sich in den Harnwegen befinden. Änderungen der Flussraten in verschiedenen Nephronsegmenten regulieren den transepithelialen Transport von Cl^- , K^+ und Na^+ , einschließlich des ENaC-vermittelten Na^+ -Transports (Kunau et al, 1974; Khuri et al, 1975). Das wird durch mehrere Mechanismen erreicht, wie zum Beispiel durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel. Das beeinflusst die Aktivität Ca^{2+} -aktivierter K^+ -Kanäle, hat aber keinen Einfluss auf ENaC (Liu et al, 2003; Morimoto et al, 2006). Laminare Scherbeanspruchung erhöht auch den ATP-Spiegel, der die ENaC-Aktivität durch Aktivierung apikaler P2Y2-Rezeptoren und Verringerung des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat-Spiegels dämpft (Ma et al, 2002; Pochynyuk et al, 2008). Das passiert, weil PIP2 ein Aktivator von ENaC ist (Ma et al, 2002). Bindungsstellen in NH_2 -Termini von β - und γ -ENaC enthalten mehrere gut konservierte positiv geladene Reste, die eine Bindungstasche bilden, die

elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den polaren Kopfgruppen der Phosphoinositide haben (Pochynyuk et al, 2007). Die flussabhängige Aktivierung von ENaC ist eine adaptive Reaktion auf eine Protein- und K^+ -reiche Mahlzeit (Satlin et al, 2001).

Wiederholte Erhöhungen des hydrostatischen Drucks induzierten einen erhöhten Kurzschlussstrom und eine erhöhte Leitfähigkeit von ENaC. Das deutet darauf hin, dass ein erhöhter hydrostatischer Druck ENaC aktiviert (Wang et al, 2003) und die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht (Carattino et al, 2004). Kanäle mit einer Zusammensetzung von $\delta\beta\gamma$ -Untereinheiten zeigen eine geringere Reaktion auf laminare Scherbeanspruchung als $\alpha\beta\gamma$ -Kanäle, weil sie eine höhere intrinsische Öffnungswahrscheinlichkeit haben (Abi-Antoun et al, 2011). Zwei Modelle existieren, um zu erklären, wie mechanosensitive Kanäle auf äußere Kräfte reagieren. Das „Doppelschichtmodell“ besagt, dass Kanäle durch Membranspannung oder Verformung, die durch mechanische Kräfte verursacht wird, verschlossen werden. Das „angebundene Modell“ schlägt vor, dass mechanische Kräfte durch interne und externe Proteine, die an den Kanal gebunden sind, direkt auf einen Kanal übertragen werden (Carattino et al, 2007; Karpushev et al, 2010). Aber die ENaC-Mechanosensitivität ist nicht von der Wahrnehmung der durch das Fließen induzierten Membranverformung oder -spannung abhängig (Carattino et al, 2007). Außerdem wird die flussabhängige Aktivierung von ENaC durch die Störung des Aktin-Zytoskeletts nicht verändert, das heißt es wird angenommen, dass das „angebundene Modell“ auch nicht richtig ist (Karpushev et al, 2010). Weiters wird als dritte Möglichkeit ein Mechanosensor in der extrazellulären Domäne diskutiert. Dieser befindet sich in der Fingerdomäne der α -Untereinheit, wo eine kleine antiparallele β -Faltblatt-Grenzfläche auf eine α -Helix trifft und eine "Klappen"-Struktur bildet (Shi et al, 2012). Andere Stellen nehmen auch an der Regulation teil; eine davon ist die „Daumen“-Domäne, wo in allen drei ENaC-Untereinheiten ein konservierter Tyrosin-Rest vorhanden ist (Shi et al, 2011). Die Porenregionen sind ebenfalls beteiligt. Da die Aktivierung von ENaC durch Scherkraft eine Änderung der Kanalsteuerung widerspiegelt, unterliegen Reste in der Pore einer Konformationsänderung als Reaktion auf Scherbeanspruchung. Diese Region ist an der Erfassung und Weiterleitung des mechanischen Stimulus beteiligt (Carattino et al, 2005).

3.4. Einfluss von Vasopressin, Kanal- Palmitoylierung, Na^+ self inhibition und circadianer Uhr

Auch ein anderes Hormon als Aldosteron hat Einfluss auf die ENaC-Aktivität; es ist das Vasopressin. Es ist für die akute hormonelle Regulation verantwortlich (Blazer-Yost et al, 1998). Vasopressin wird als Reaktion auf Hypovolämie, Hypotonie oder osmotische Veränderungen vom Hypothalamus in das Blut freigesetzt (Dee U. Silverthorn, 2009). Die Bindung von Vasopressin an seinen V2-Rezeptor in der Niere aktiviert die Adenylatcyclase, um ATP in cAMP umzuwandeln, was wiederum die PKA-Spiegel erhöht (Coleman and Wade, 1994; Butterworth et al, 2001). cAMP inhibiert die Nedd4-2-Funktion und Nedd4-2 ist auch ein Substrat für die Phosphorylierung durch PKA an Serinstellen (Snyder et al, 2004a). Was erfolgt ist die Erhöhung des Na^+ -Transports hauptsächlich durch Erhöhung der Kanaldichte an den apikalen Membranen durch Fusion von ENaC-haltigen Vesikeln mit dieser Membran (Coleman and Wade, 1994).

Bei der Palmitoylierung erfolgt über eine Thioesterbindung eine Addition einer Palmitinsäure mit 16 Kohlenstoffatomen an Cysteinreste (Schmidt und Schlesinger, 1979). Die Palmitoylierung von Transmembranproteinen findet normalerweise an Stellen neben den Transmembrandomänen oder basischen Resten statt und kann Wechselwirkungen einer bestimmten Proteindomäne mit der Membran oder mit membranassoziierten Proteinen, Proteinkonformation und -funktion, Proteinstabilität oder -abbau oder einer Kombination davon beeinflussen. Die Cystein-Palmitoylierung wird als häufige posttranslationale Modifikation angesehen, die posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Membranwechselwirkungen und Proteinkonformation und damit die Aktivität der Ionenkanäle und seiner Modifikatoren kontrolliert (Schmidt and Catterall, 1987). Palmitoylierende Enzyme werden als DHHCs bezeichnet, weil ihre Bindungsstelle eine Asp-His-His-Cys (DHHC) Sequenz hat (Ohno et al, 2006). Die β - und γ -Untereinheiten haben diese Modifikation, die α -Untereinheit jedoch nicht (Mueller et al, 2010; Mukherjee et al, 2014). Palmitoylierung aktiviert ENaC durch Erhöhung der Kanalöffnungswahrscheinlichkeit und Stabilisierung des offenen Zustands des Kanals. Die Verhinderung der Palmitoylierung der γ -Untereinheit hat eine dominantere Rolle bei der Inhibierung von ENaC im Vergleich zur Verhinderung der Palmitoylierung der β -Untereinheit (Mukherjee et al, 2014).

ENaC transportiert nicht nur Na^+ , es wird auch durch extrazelluläres Na^+ gehemmt. Dieses Phänomene heißt *Na^+ self inhibition* und es stellt eine Verringerung der Kanalöffnungs-

wahrscheinlichkeit als Reaktion auf externes Na^+ dar (Fuchs et al, 1977; Sheng et al, 2006). Na^+ bindet an Bindungsstellen in der extrazellulären Domäne, wovon mehr als 90 existieren und sie wirken als Übergang zum Kanalgate (Kashlan et al, 2015; Sheng et al, 2006). Die Na^+ -Selbsthemmung stellt einen Mechanismus für Zellen im distalen Nephron bereit, welcher eine schnelle Einstellung der Rate des Na^+ -Einstroms entsprechend den Fluktuationen des Urins ermöglicht. Dieser Regulierungsprozess kann die Na^+ -Resorption in den Nierentubuli bei hoher Na^+ -Konzentration im Urin begrenzen. Umgekehrt befreit ein niedriger Na^+ -Spiegel ENaC-Kanäle von der Na^+ -Selbsthemmung, verbessert die Na^+ -Reabsorption und minimiert die Na^+ -Verluste im Urin. Manche Faktoren können diesen Mechanismus beeinflussen; dies sind die Proteasen, die ENaC spalten, extrazelluläre Metallionen, extrazelluläres Cl^- und Protonen (Sheng et al, 2004, 2006; Collier and Snyder, 2009a, 2009b). Nicht gespaltene Kanäle zeigen eine deutlich verstärkte Na^+ -Selbsthemmungsreaktion sowie eine sehr geringe Aktivität und geringe Öffnungswahrscheinlichkeit, wenn die extrazelluläre Na^+ -Konzentration hoch ist. Diese Kanäle gehen in einen Zustand mit höherer Offenwahrscheinlichkeit über, wenn der extrazelluläre Na^+ -Spiegel niedriger wird (Sheng et al, 2006). Zn^{2+} stimuliert ENaC mit einem Verlust von Na^+ -Selbsthemmung (Sheng et al, 2004). Protonen erhöhen auch die Kanalöffnungswahrscheinlichkeit durch Aufhebung der Na^+ -Selbsthemmung. Durch diesen Mechanismus beeinflusst der pH-Wert die Aktivität von ENaC. Ein saurer pH-Wert erhöht die Aktivität, während ein alkalischer pH-Wert die Aktivität verringert (Collier and Snyder, 2009b). Mit zunehmender Konzentration von extrazellulärem Cl^- wird eine dosisabhängige Verringerung des ENaC Na^+ -Stroms beobachtet. Eine hohe Konzentration an Cl^- verstärkt also die Na^+ -Selbsthemmung (Collier and Snyder, 2009a).

Zusätzlich ist ein weiteres Regulationssystem beteiligt an der Regulation mehrerer physiologischer Funktionen, einschließlich des Blutdrucks und der Nierenfunktion. Es ist die zirkadiane Uhr. Eines der Clock-Proteine, nämlich Periode 1, reguliert die Expression und Aktivität von α -ENaC. Dieser Signalweg beeinflusst sowohl die Aldosteron-abhängige als auch -unabhängige Regulation von ENaC. Die Hemmung der zirkadianen regulatorischen Kinasen Caseinkinase (CK) 1 δ und CK1 ϵ , die anschließend die Aktivität von Periode 1 hemmen, verringern die ENaC-Expression und verhindern auch die Transkriptionsantwort von α -ENaC auf Aldosteron (Gumz et al, 2009).

4. MUTATIONEN VON ENaC MIT EINFLUSS AUF DEN BLUTDRUCK

Sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren bestimmen die Populationsvariabilität des Blutdrucks. Der Blutdruck ist ein quantitatives Merkmal, das normalerweise in der Gesamtbevölkerung normal verteilt ist und einem Vererbungsmuster folgt, was darauf hindeutet, dass es sich um ein polygenes Merkmal handelt. Analysen unter Verwendung des Blutdruck-Varianz-Komponenten-Modells gehen davon aus, dass ungefähr 40–50% der Populationsvariationen auf genetische Einflüsse zurückzuführen sind. Aber es gibt eine Reihe seltener erblich bedingter monogener Störungen, die durch Mutation in einem einzelnen Gen deutliche Veränderungen des Blutdrucks hervorrufen (Harrap et al, 2000). Mutationen von ENaC gehören auch in diese Gruppe. Bei ENaC kommen zwei Typen von Mutationen vor, *gain-of-function* Mutationen und *loss-of-function* Mutationen.

4.1. *Gain-of-function* Mutationen und Liddle Syndrom

Gain-of-function Mutationen sind Mutationen mit erhöhter Funktion des Kanals. Das Liddle Syndrom ist eine davon. Es ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung und seine Symptome sind früh einsetzende Hypertonie in Verbindung mit Hypokaliämie, metabolischer Alkalose und niedrigem Niveau an Renin-Aktivität und Aldosteron (Liddle et al, 1963; Hansson et al, 1995). Die Renin- und Aldosteron-Spiegel sind wichtig in Hinsicht auf die Diagnose, weil sie zwischen Hyperaldosteronismus und Liddle Syndrom, welches als Pseudo-Hyperaldosteronismus bezeichnet werden kann, zu differenzieren helfen. Bei Patienten mit Liddle-Syndrom, sind Renin- und Aldosteron-Spiegel niedrig im Gegensatz zu Patienten mit Hyperaldosteronismus, bei denen der Aldosteronspiegel hoch sind (Lifton et al, 1992). Aufgrund normaler Aldosteronspiegel wirkt Spironolacton bei Patienten mit Liddle-Syndrom nicht (Liddle et al, 1963). Das Medikament der Wahl ist also Amilorid. Es funktioniert gut bei diesem Syndrom, da es ENaC direkt hemmt. Amilorid wird täglich in einer Dosis zwischen 5 und 20 mg verschrieben. Triamteren, ein weiteres kaliumsparendes Diuretikum, ähnlich wie Amilorid, kann ebenfalls zur Behandlung dieses Syndroms verwendet werden (Bubien et al, 1992). Liddle-Syndrom bedingte Hypertension ist empfindlich auf eine salzarme Ernährung und diätetische Salzrestriktion verstärkt ebenso die Wirkung von Amilorid und Triamteren. Hypertonie führt zu Kopfschmerzen, Schwindel, Retinopathie, chronischer Nierenerkrankung, linksventrikulärer Hypertrophie oder sogar zu plötzlichem Tod. Hypokaliämie kann auch Muskelschwäche, Polyurie und Polydipsie verursachen. Aufgrund

resistenter Hypertonie, Hypokaliämie und ventrikulärer Hypertrophie kann ein Patient tödliche Arrhythmien entwickeln, die zum plötzlichen Tod führen können (Botero-Velez, 1994).

Das Liddle-Syndrom wird durch Missense-Mutationen im PY-Motiv der β -oder γ -Untereinheit von ENaC verursacht. Nonsense- oder Frameshift-Mutationen können das auch verursachen, weil sie zu einer Verkürzung des C-Terminus und zum Verlust des PY-Motivs in diesen Untereinheiten führen (Shimkets et al, 1994; Hansson et al, 1995; Schild et al, 1996). Die Mutation oder Eliminierung des PY-Motivs unterbricht die Bindung der Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 an das PY-Motiv. Das heißt, dass ENaC nicht ubiquitinyliert werden kann, also nicht abgebaut wird. Dies führt zu einer Ansammlung von aktiven Kanälen an der Zelloberfläche und einer erhöhten Na^+ -Reabsorption in der Niere, was zu einem erhöhten Blutvolumen und Blutdruck führt. Obwohl es in der α -Untereinheit auch ein PY-Motiv gibt, wurde bisher kein Fall von Liddle-Syndrom mit einer Mutation in der α -Untereinheit berichtet (Rotin and Staub, 2011).

4.2. Loss-of-function Mutationen, Pseudohypoaldosteronismus

Loss-of-function Mutationen sind dagegen Mutationen, bei denen es zum Verlust der Kanalfunktion kommt. Bei ENaC-Mutationen gehört Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 zu dieser Gruppe (Cheek and Perry, 1958). Drei Formen dieser Erkrankung existieren. Es gibt eine systemische Form, eine renale Form und eine sekundäre Form. Beim renalen Typ ist die Aldosteronresistenz nur in der Niere eingeschränkt. Diese Form wird durch *nonsense*, *missense* und *frameshift* Mutation im Mineralokortikoidrezeptor verursacht und wird autosomal dominant vererbt. Mutationen sind in allen Exons zu finden und es gibt keinen Hotspot für Mutationen (Geller et al, 1998). Sie sind bevorzugt in der Ligandenbindungsdomäne und DNA-Bindungsdomäne lokalisiert. Das führt dazu, dass Aldosteron nicht binden kann, und wenn schon, dann kann es nicht wirken (Sartorato et al, 2003). Dann sind auch die Symptome nicht so stark ausgeprägt wie bei systemischen Form; es sind meistens Gedeihstörung, Dehydratation und Erbrechen, Hyponatriämie, Hyperkaliämie und metabolische Azidose, aber die Hyperkaliämie ist im Allgemeinen mild und eine metabolische Azidose ist nicht immer nachweisbar (Geller et al, 1998). Bei Neugeborenen wird Salz gegeben, aber das wird ab einem Alter von 1-3 Jahren unnötig. Man erklärt das damit, dass die Reifung der Salzurückhaltefähigkeit der Niere durch Ersatz der

distalen Natriumresorption durch proximale Teile des Tubulus erreicht wird. Natriumergänzung reicht normalerweise aus, um den erhöhten Kaliumspiegel zu senken (Kuhnle et al, 1990). Danach reicht das klinische Spektrum von gesunden, nicht betroffenen Patienten, Patienten ohne Elektrolytstörungen, aber mit erhöhten Plasma-Renin- und Aldosteronspiegeln bis zu Patienten mit klinisch manifestem Nieren-Salzverlust (Riepe et al, 2006). Ein erhöhter Aldosteronspiegel bleibt der einzige biochemische Marker für autosomal dominanten PHA1 im Erwachsenenalter (Geller et al, 2006).

Sekundärer PHA1 im Säuglingsalter ist ein vorübergehender Zustand, der bei Säuglingen zwischen 6 und 12 Monaten auftritt. Er ist stark mit Harnwegsinfektionen und Harnwegsfehlbildungen assoziiert (Melzi et al, 1995). Die Symptome, Gedeihstörung und Erbrechen, klingen nach einer Antibiotikatherapie gegen Bakteriurie oder nach einer Reparatur der zugrunde liegenden strukturellen Harnwegsanomalien ab. Mehrere Zytokine, wie z. B. transformierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Interleukin-1 und -6, sind bei der Harnwegsinfektion erhöht; sie führen zur Herunterregulierung des Aldosteronrezeptors (Bizzarri et al, 2016).

Die systemische Form von Pseudohypoaldosteronismus Typ 1B (PHA1B) ist autosomal rezessiv vererbt. Er verursacht einen schweren lebenslangen Salzverlust in mehreren Zielgeweben wie Niere, Schweißdrüsen, Speicheldrüsen, Dickdarmepithel und Lunge. Es kommt zu extrem hohem Salzverlust in der Niere und dadurch auch zu Wasserverlust. Das führt zu Dehydratation, zu niedriger Plasmanatriumkonzentration, Hyperkaliämie und Hypotonie. Andere Symptomen sind noch Erbrechen, Probleme in den Atemwegen, Herzrhythmusstörungen wegen Hyperkaliämie, Cholelithiasis und Hautkomplikationen wie Dermatitis. Alle diese Symptome fangen schon im Neugeborenenalter an (Chang et al, 1996). Atemwegsbeschwerden werden durch eine beeinträchtigte Absorption von Flüssigkeit von der Atemwegsoberfläche verursacht. Die Patienten leiden unter Husten, Keuchen und wiederkehrenden Infektionen der oberen und unteren Atemwege (Kerem et al, 1999). PHA1B wird durch Mutationen in Genen, die für α -, β - oder γ - Untereinheiten kodieren, verursacht. Die Mehrheit der Mutationen sind *Frameshift*- oder *Nonsense*-Mutationen, die zu verkürzten oder vollständig abnormen Proteinen führen, die nicht funktionsfähig sind (Chang et al, 1996). Renin- und Aldosteron-Spiegel im Blut sind hoch, aber sie können den Elektrolythaushalt nicht beeinflussen. Das systemische PHA1 ist eine lebenslange Krankheit, die im Laufe der Zeit keine Besserung zeigt. Patienten sind anfällig für lebensbedrohliche

Salzverlustkrisen in Kombination mit schwerer Hyperkaliämie und Dehydration. Die medizinische Versorgung besteht aus einer umfangreichen Natriumchloridergänzung vom Neugeborenenalter an. Um Herzrhythmusstörungen, die durch schwere Hyperkaliämie verursacht werden, zu vermeiden, sind zusätzliche Maßnahmen notwendig; so sind Ionenaustauscher nur in der Lage den Kaliumwert zu senken (Zennaro and Lombes, 2004). Es ist eine rein symptomatische Therapie, denn es gibt derzeit keine Therapie mit pharmakologisch wirksamen Mitteln. Neue Arzneistoffe sind jedoch in Entwicklung um diese Lücke zu füllen.

Das synthetische, cyclische Peptid Solnatid besteht aus 17 Aminosäureresten und ähnelt der Lectin-Domäne (TIP) des menschlichen Tumornekrosefaktors TNF (Lucas et al, 1994). Der Tumornekrosefaktor ist ein entzündliches Zytokin; seine hauptsächliche Aufgabe ist die Abwehr pathogener Keime. Diese Funktion erfüllt TNF über seine TNF-Rezeptor-Bindungsstelle. Davon zu unterscheiden ist eine andere wichtige Stelle im TNF-Molekül, welche als Lectin-ähnliche Domäne bezeichnet wird. Diese Domäne scheint eine ganz andere Wirkung zu haben als die TNF-Rezeptor-Bindungsstelle, nämlich die Auflösung des Alveolarödems und Regulierung des Flüssigkeitshaushaltes (Fukuda et al, 2001; Elia et al, 2003). Dieser Effekt ist durch Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit epithelialer Natriumkanäle und einem vermehrten Transport der Kanäle zur Membran und dadurch wird Aktivierung von ENaC bedingt (Shabbir et al, 2013; Hazemi et al, 2010). Die Lectin-ähnliche Domäne von TNF erkennt und interagiert mit spezifischen Oligosaccharideinheiten, insbesondere N, N'-Diacetylchitobiose (Sherblom et al, 1988). TIP kann also mit Kohlenhydratgruppen im extrazellulären Teil von ENaC-Untereinheiten interagieren (Shabbir et al, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Solnatid in *in-vitro* Versuchen bei *loss-of-function* ENaC-Mutationen den Natriumstrom erhöhen kann. Diese Mutationen in α -, β - und γ -ENaC sind dafür bekannt, dass sie Pseudohypoaldosteronismus Typ 1B (PHA1B) verursachen. Solnatide erhöht die ENaC-Aktivität in den mutierten ENaC-exprimierenden Zellen wieder auf das Niveau von nicht mutierten Zellen (Willam et al, 2017).

TNF hat drei Lectin-ähnliche-Domänen (Sprang and Eck, 1992), weswegen es ein hochpotenter Aktivator von ENaC ist. Es hat aber auch die TNF-Rezeptor-Bindungsstelle, welche für entzündliche Reaktionen verantwortlich ist und das würde zu starken Nebenwirkungen führen. Solnatid und ein weiteres TIP-Peptid, AP318 (Abbildung 6), besitzen nur eine Lectin-ähnliche Domäne und die TNF-Rezeptor-Bindungsstelle fehlt, was

erwarten lässt, dass die unerwünschten TNF-Wirkungen nicht auftreten. Das maximale Ausmaß der ENaC-stimulierenden Wirkung ist größer mit Solnatid im Vergleich zu TNF und die Wirkung wird schneller erreicht. Der Grund für den langsameren Aktivierungsverlauf und den durch TNF induzierten geringeren Strom könnte sein, dass TNF ein sperrigeres, größeres Molekül ist als Solnatid und daher mehr Raum um die extrazelluläre Schleife von ENaC einnimmt. Um die extrazelluläre Schleife könnten im Vergleich mehr Solnatidmoleküle untergebracht werden und mit den Glykosylierungs- oder anderen Wechselwirkungsstellen interagieren. TNF und Solnatid brauchen auch den C-Terminus für die Aktivierung des Kanals, wofür die Moleküle erst die Membran durchdringen müssen. Das kann ein anderer Grund für die langsamere TNF-Aktivierung von ENaC im Vergleich zu Solnatid sein. Der Unterschied in der für die Aktivierung von ENaC erforderlichen Zeit würde widerspiegeln, dass TNF und Solnatid in die Plasmamembran nicht gleichartig eindringen. Die Bindung der Triade von Lectin-ähnlichen Domänen an der Spitze des nativen TNF-Homotrimers an Glykosylierungsstellen extrazellulärer Schleifen von ENaC könnte die weitere Faltung und anschließende Penetration des TNF-Moleküls durch die Plasmamembran behindern (Willam et al, 2017; Czikora et al, 2014). Solnatid hat eine Disulfidbrückenbindung zwischen Cystein 1 und 17. Diese Bindung ist aber nicht stabil. AP318 ist eine bessere Alternative, weil die zwei Cysteine ausgetauscht wurden und sie können keine Disulfidbrücke mehr binden, sondern nur eine Peptidbindung (Hazemi et al, 2010).

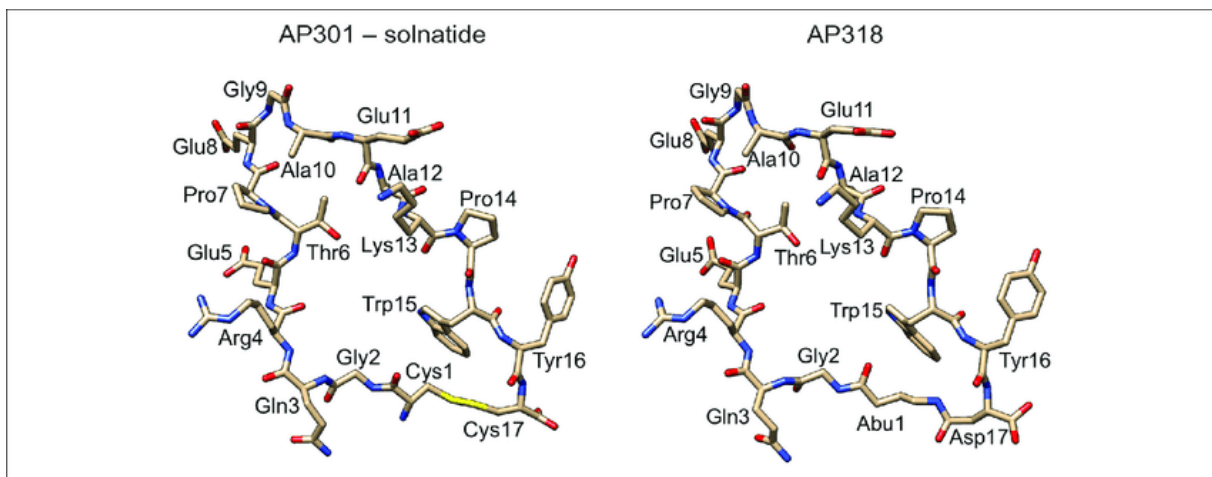


Abbildung 6: Solnatid besitzt eine Disulfidbrückenbindung zwischen Cystein 1 und 17, welche aber nicht stabil ist. AP318 hat schon eine Peptidbindung zwischen Aminosäure 1 und 17, welche die Verbindung stabiler macht. (Willam et al, 2017)

Frühere Studien haben gezeigt, dass ausgewählte Mutationen im TM2-Trakt dramatische Auswirkungen auf das Channel-Gating haben (Waldmann et al, 1995; Snyder et al, 2000).

Deshalb habe ich mein Experiment mit einer ENaC-Mutante mit Mutation in der TM2 Domäne gemacht. Die Mutation befindet sich in der α -Untereinheit, nämlich die 560. Aminosäure, welche normalerweise ein Glycin ist, ist mit einem Serin ausgetauscht. Es ist eine Punktmutation und hat somit keinen Einfluss auf die Länge des Kanalproteins wie das der Fall bei *frame-shift* Mutationen ist. Aber diese beiden Aminosäuren, Glycin und Serin, haben unterschiedliche Eigenschaften. Glycin ist die einfachste Aminosäure, sie hat keine lipophile oder hydrophile Seitenketten. Transmembrandomänen brauchen keine oder nur wenige hydrophile Aminosäure und daher passt Glycin passt gut in eine Transmembrandomäne. Im Gegensatz dazu hat Serin eine hydrophile Seitenkette und ist aus diesem Grund nicht so gut für eine Transmembrandomäne geeignet. Aus diesem Grund wird die Faltung des Kanals nicht richtig ablaufen und der Kanal kann nicht optimal funktionieren, wodurch es zu eine *loss-of-function* Mutation kommt.

Meine Aufgabe war zu entdecken ob Solnatid und AP318 die Funktion dieser Mutation wieder herstellen können und eine Aktivitätserhöhung erreicht werden kann. Die Aktivitätserhöhung kann durch veränderte Kinetik oder Expression des Kanals erfolgen. Ich habe den Einfluss auf die Anzahl der Kanäle in der Zellmembran gemessen, wofür die *Western Blot* Methode geeignet ist. Die Zelllinie, die ich für die Experimente verwendet habe, heißt HEK293. Dabei handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen. Das heißt sie stammen aus der menschlichen Niere, sodass sie zur Expression von humanen Proteinen, beispielsweise ENaC-Proteinen, verwendet werden können, da sie endogen keine epithelialen Natriumkanäle exprimieren.

Die Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FBS und 1% Penicillin-Streptomycin-Gemisch in 25 cm Gewebekulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden in einem angefeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ gehalten. Als sie die Konfluenz von 80% erreichten, wurden sie passagiert. Es passierte zweimal pro Woche. Der erste Schritt ist das Absaugen des Mediums, dann wurden die toten Zellen mit 1 ml Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, *phosphate buffered saline*) abgewaschen, dann wurde PBS abgesaugt. Es wurden 500 µl Trypsin / EDTA zugegeben und anschließend die Zellen im Inkubator 5 Minuten damit inkubiert. Die Ablösung der Zellen vom Boden wurde unter dem Mikroskop visuell

kontrolliert. Die abgelösten Zellen wurden mit 4,5 ml Medium resuspendiert. 1 ml der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche gefüllt, die mit 4,5 ml neuem Medium gefüllt war.

Der nächste Schritt ist die Transfektion. Zur Transfektion wurden die Zellen in Zellkulturplatten ausgesät. Als die Zellkonfluenz auf der Platte 60-80% erreichte, waren die Zellen zur Transfektion bereit. Die Reagenzien wurden in zwei Gruppen unterteilt, eine für die Wildtyp-ENaC-DNA und eine für die mutierte ENaC-DNA. Die Reagenzien waren serumfreies Medium, DNA (Wildtyp- α -ENaC / Mutante- α -ENaC, Wildtyp- β -ENaC und Wildtyp- γ -ENaC) und Transfektionsreagenz. Die Reagenzien wurden in einem Eppendorf Safe-Lock-Röhrchen gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurden die Zellen vorbereitet, sodass sie mit 1 ml PBS gewaschen wurden. Nach der Inkubation wurden die Reagenzien zu den Zellen gegeben, und danach wurde das Medium auch zu den Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden über eine Nacht bei 37 °C inkubiert.

Wenn nicht genug DNA für die Transfektion vorhanden war, musste man diese multiplizieren. Die Vermehrung erfolgte in E. coli-Zellen. Die E. coli-Zellen, β -Mercaptoethanol und die DNA wurden gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. E. coli-Zellen sollten die DNA aufnehmen, sodass die Zellen einen Hitzeschock von 42 °C erleiden mussten. Danach erholten sich die Zellen auf Eis. Den Zellen wurde NZY⁺-Medium zugesetzt, damit sie besser wachsen konnten. Sie wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 100 μ l Zellsuspension auf eine Agarplatte gegeben und danach wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C auf der Agarplatte gezüchtet. Am nächsten Tag war das Wachstum auf der Platte visuell kontrollierbar. Nur eine Bakterienkolonie wurde von der Platte genommen und in ein Reagenzgefäß gelegt, das Ampicillin-LB-Medium enthielt (1: 100). Das Reagenzglas wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur auf Wachstum kontrolliert und dann wurde die Kultur in ein anderes Röhrchen mit 500 ml Medium und Ampicillin (1: 100) gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen lysiert und die DNA mit Hilfe von MidiPrep Kit extrahiert. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde durch Nanodrop definiert.

Nach der Transfektion wurden zwei Platten mit HEK293-Zellen, die mit der Wildtyp-DNA transfiziert waren, und zwei Platten mit HEK293-Zellen, die mit der mutierten DNA

transfiziert waren, sowie eine Platte mit nicht transfizierten Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Während der zwei Nächte exprimierten die Zellen die ENaC-Proteine, sodass der nächste Schritt die Behandlung mit den Wirkstoffen war. Eine Platte mit nicht transfizierten, unbehandelten Zellen diente als Negativkontrolle. Eine Zellplatte mit Wildtyp-ENaC und eine Zellplatte mit mutiertem ENaC blieben unbehandelt. Acht Zellplatten wurden mit Testsubstanz versetzt, vier mit dem ersten Wirkstoff AP301 und vier mit dem zweiten Wirkstoff AP318. Eine AP301-Gruppe wurde fünf Minuten lang und die zweite zehn Minuten lang behandelt. Dasselbe geschah mit der AP318-Gruppe. Die Wirkstofflösung auf den Zellen hatte eine Konzentration von 200 nM.

Der nächste Schritt war die Biotinylierung. Die Biotinlösung musste vorbereitet und auf Eis gelagert worden sein. Biotin bindet an Membranproteine; die Biotinlösung musste zwei Stunden lang mit den Zellen geschüttelt werden. Danach wurde den Zellen Quenclösung zugesetzt und sie wurden in einem Röhrchen gesammelt. Dann wurden die Zellen mit Lysepuffer versetzt und mit Ultraschall behandelt bis die Zellmembran brach. Die Lyse-Lösung enthielt Protease-Inhibitor-Cocktail oder Leupeptin, sodass die Proteasen der Zelle die Membranproteine zu diesem Zeitpunkt nicht zerstören konnten. Die Lösung wurde zu den Agarose-Beats gegeben; diese waren bereits hergestellt. Die Agarose-Beats binden Biotin und die Biotin-gebundenen Proteine und bleiben am nächsten Tag nach dem Zentrifugieren aufgrund ihres Gewichts unten im Röhrchen. Die Flüssigkeit wurde verworfen. Probenpuffer (1:4 × Probenpuffer und Wasser + 1:10 Proteaseinhibitorcocktail oder Leupeptin) wurde zu den Agarose-Beats gegeben.

Der nächste Schritt war die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Diese Methode trennt Proteine nach dem Molekulargewicht. Zuerst wurden die Gele hergestellt, ein 12,5%-iges Trenngel und ein 5%-iges Sammelgel. Wasser, *lower* Tris, Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung, 10%-ige SDS-Lösung (Sodiumdodecyl-sulfat), 10%-ige APS-Lösung (Ammoniumpersulfat) und TEMED (N, N', N' -Tetramethylethylen-diamin) wurden für das Trenngel gemischt und dann schnell zwischen zwei versiegelte Glasplatten gegossen. Acrylamid war der Gelbildner, Bisacrylamid der Quervernetzer, TEMED und APS waren für den Polymerisationsstart verantwortlich. Zur Beseitigung von Unebenheiten und Luftblasen wurde anschließend Isopropanol zugesetzt. Nach einer Stunde polymerisierte das Gel und es war fest. Das Isopropanol wurde entfernt und das Wasser,

Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung, *upper* Tris, 10%-ige SDS-Lösung, 10%-ige APS-Lösung und TEMED wurden für das 5%-ige Gel gemischt. Anschließend wurde es über das Trenngel gegossen und der Kamm mit 15 Taschen eingesetzt. Nach einer Stunde konnte das Gel polymerisieren und der Kamm entfernt werden. Die Glasplatten wurden in die Elektrophoresekammer überführt, die mit 1x Laufpuffer gefüllt war.

Die Proteine mussten durch Hitze (65 °C) denaturiert werden. 5 µl des Markers wurden in die erste Tasche geladen; der Marker ermöglicht den Vergleich der Molekülgrößen. In die verbleibenden Taschen wurden 15 µl der Proteinlösungen geladen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V durchgeführt und es dauerte weniger als zwei Stunden, bis die Bänder das untere Ende der Glasplatte erreichten. Danach wurden die Platten aus der Kammer entfernt, die Platte wurde geöffnet und das Sammelgel wurde entfernt.

Der nächste Schritt war das *semi-dry Blotting*. Der Sinn dieses Schrittes ist die Proteine aus dem Trenngel auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen. Dafür braucht man Filterpapier und natürlich eine Nitrocellulosemembran. Die Membran musste man genau schneiden und danach wurde sie mit dem Filterpapier in *Towbin Buffer* eingeweicht. Die Membran und das Trenngel befanden sich zwischen zwei Filterpapieren, die Luftblasen wurden mit einem Roller entfernt und die Proteine wurden innerhalb von 30 Minuten bei 25 V und 1 mA übertragen.

Danach wurde die Membran in eine kleine Box übertragen und 3%-ige BSA-Lösung (*Bovine Serum Albumin*) und 0,02% Natriumazid wurden zugegeben. Mit dieser Lösung wurde die Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. BSA blockt die unspezifischen Bindungsstellen an der Membran, sodass die Antikörper nicht daran binden können. Am nächsten Tag wurde die Membran mit TBS-T-Puffer (*Tris-buffered saline with Tween 20*) gewaschen und danach mit 10 ml Lösung aus primärem Antikörper (anti-ENaC Antikörper) über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Antikörper bindet an eine Proteinsequenz an den Stellen 40-42, das heißt diese Stelle war sowohl bei Wildtyp und als auch bei der Mutante vorhanden, und der Antikörper konnte sowohl an Wildtyp als auch an die Mutante binden. Nachher wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und schließlich wurde der sekundäre Antikörper zugesetzt. Sekundäre Antikörper sind gegen bestimmte primäre Antikörper gerichtet und verstärken ihr Signal. Der sekundäre Antikörper war an HRP (*horse radish peroxidase*) gekoppelt, was für die Detektion wichtig ist. Am Ende wurde die Membran noch zweimal mit TBS-T gewaschen und schließlich einmal mit TBS. Für die Detektion wurde ECL (*enhanced*

chemiluminescence) Substrat hinzugefügt und für 8 Minuten damit inkubiert. Nach der Reaktion erschienen die dunklen Banden am Gerät.

5. REFERENZEN

- Abi-Antoun T, Shi S, Tolino LA, Kleyman TR and Carattino MD. Second transmembrane domain modulates epithelial sodium channel gating in response to shear stress, *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 2011; 300(5):F1089-1095.
- Alvarez de la Rosa D, Gimenez I, Forbush B and Canessa CM. SGK1 activates Na⁺-K⁺-ATPase in amphibian renal epithelial cells, *American Journal of Physiology, Cell Physiology* 2006; 290(2):C492-498.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE and Evans RM. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor, *Science* 1987; 4812: 268-275.
- Ayrolidi E, Zollo O, Macchiarulo A, Di Marco B, Marchetti C and Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1, *Molecular Cell Biology* 2002; 22(22): 7929–7941.
- Bhalla V, Daidié D, Li H, Pao AC, LaGrange LP, Wang J, Vandewalle A, Stockand JD, Staub O and Pearce D. Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 regulates ubiquitin ligase neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated protein 4-2 by inducing interaction with 14-3-3, *Molecular Endocrinology* 2005; 19(12): 3073-3084.
- Bizzarri C, Pedicelli S, Cappa M and Cianfarani S. Water Balance and 'Salt Wasting' in the First Year of Life: The Role of Aldosterone-Signaling Defects, *Hormone Research in Paediatrics* 2016; 86(3):143-153.
- Blazer-Yost BL, Liu X and Helman SI. Hormonal regulation of ENaCs: insulin and aldosterone, *American Journal of Physiology* 1998; 274(5):C1373-1379.
- Botero-Velez M, Curtis JJ and Warnock DG. Brief report: Liddle's syndrome revisited, *New England Journal of Medicine* 1994; 330:178–181.
- Boyd C and Náray-Fejes-Tóth A. Gene regulation of ENaC subunits by serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1, *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 2005; 288(3):F505-512.
- Bruns JB, Carattino MD, Sheng S, Maarouf AB, Weisz OA, Pilewski JM Hughey RP and Kleyman TR. Epithelial Na⁺ channels are fully activated by furin- and prostaticin-dependent release of an inhibitory peptide from the gamma-subunit, *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282:6153–6160.

- Butterworth MB, Helman SI and Els WJ. cAMP-sensitive endocytic trafficking in A6 epithelia, *American Journal of Physiology, Cellular Physiology* 2001; 280(4):C752-762.
- Caldwell RA, Boucher RC and Stutts MJ. Neutrophil elastase activates near-silent epithelial Na⁺ channels and increases airway epithelial Na⁺ transport, *American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology* 2005; 288(5):L813-819.
- Caldwell RA, Boucher RC and Stutts MJ. Serine protease activation of near-silent epithelial Na⁺ channels, *American Journal of Physiology, Cell Physiology* 2004; 286:C190–C194.
- Canessa CM, Merillat AM, Rossier BC. Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells, *American Journal of Physiology* 1994; 267: C1682–C1690.
- Canessa CM, Horisberger JD and Rossier BC. Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration, *Nature* 1993; 361:467–470.
- Cantiello HF, Stow JL, Prat AG and Ausiello DA. Actin filaments regulate epithelial Na⁺ channel activity, *American Journal of Physiology* 1991; 261:C882-888.
- Carattino MD, Sheng S, Bruns JB, Pilewski JM, Hughey RP and Kleyman TR. The epithelial Na⁺ channel is inhibited by a peptide derived from proteolytic processing of its alpha subunit, *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281:18901–18907.
- Carattino MD, Liu W, Hill WG, Satlin LM and Kleyman TR. Lack of a role of membrane-protein interactions in flow-dependent activation of ENaC, *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 2007; 293(1):F316-324.
- Carattino MD, Hughey RP and Kleyman TR. Proteolytic processing of the epithelial sodium channel gamma subunit has a dominant role in channel activation, *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283:25290–25295.
- Carattino MD, Sheng S and Kleyman TR. Epithelial Na⁺ channels are activated by laminar shear stress, *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(6):4120-4126.
- Carattino MD, Sheng S and Kleyman TR. Mutations in the pore region modify epithelial sodium channel gating by shear stress, *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280:4393-4401.
- Chang SS, Grunder S, Hanukoglu A, Rösler A, Mathew PM, Hanukoglu I, Schild L, Lu Y, Shimkets RA, Nelson-Williams C, Rossier BC and Lifton RP. Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1, *National Genetics* 1996; 12(3):248-253.

- Cheek DB and Perry JW. A salt wasting syndrome in infancy, *Archives of Disease in Childhood* 1958; 33(169):252-256.
- Coleman RA and Wade JB. ADH-induced recycling of fluid-phase marker from endosomes to the mucosal surface in toad bladder, *American Journal of Physiology* 1994; 267(1 Pt 1):C32-38.
- Collier DM and Snyder PM. Extracellular chloride regulates the epithelial sodium channel, *Journal of Biological Chemistry* 2009a; 284(43):29320-29325.
- Collier DM and Snyder PM. Extracellular protons regulate human ENaC by modulating Na⁺ self-inhibition, *Journal of Biological Chemistry* 2009b; 284(2):792-798.
- Czikora I, Alli A, Bao HF, Kaftan D, Sridhar S, Apell HJ, Gorshkov B, White R, Zimmermann A, Wendel A, Pauly-Evers M, Hamacher J, Garcia-Gabay I, Fischer B, Verin A, Bagi Z, Pittet JF, Shabbir W, Lemmens-Gruber R, Chakraborty T, Lazrak A, Matthay MA, Eaton DC and Lucas R. A novel TNF-mediated mechanism of direct epithelial sodium channel activation, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2014; 190(5):522-532.
- Davis JO, Hartroft PM, Titus EO, Carpenter CC, Ayers CR, Spiegel HE. The role of the renin angiotensin system in the control of aldosterone secretion, *Journal of Clinical Investigation* 1962; 41:378–389.
- Davis JO, Carpenter CC, Ayers CR, Holman JF, Bahn RC. Evidence for a secretion of an aldosterone stimulating hormone by the kidney, *Journal of Clinical Investigation* 1961; 40:684-696.
- Dee U. Silverthorn: Physiologie, 4. aktualisierte Auflage 2009
- Diakov A and Korbmacher C. A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's alpha-subunit, *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 38134-38142.
- Edwards CRW, Burt D, McIntyre MA, Dekloet ER, Stewart PM, Brett L, Sutanto WS, Nibder C. Localisation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase—tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor, *Lancet* 1988; 2(8618):986-989.
- Elia N, Tapponnier M, Matthay MA, Hamacher J, Pache JC, Brundler MA, Totsch M, De Baetselier P, Fransen L, Fukuda N, Morel DR, Lucas R. Functional identification of the alveolar edema reabsorption activity of murine tumor necrosis factor-alpha, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003; 168(9):1043-1050.

- Eschlböck S, Wenning G and Fanciulli A. Evidence-based treatment of neurogenic orthostatic hypotension and related symptoms, *Journal of Neural Transmission* 2017; 124:1567–1605.
- Fakitsas P, Adam G, Daidié D, van Bemmelen MX, Fouladkou F, Patrignani A, Wagner U, Warth R, Camargo SM, Staub O, Verrey F. Early aldosterone-induced gene product regulates the epithelial sodium channel by deubiquitylation, *Journal of American Society of Nephrology* 2007; 18(4):1084-1092.
- Firsov D, Robert-Nicoud M, Gruender S, Schild L, Rossier BC. Mutational analysis of cysteine-rich domains of the epithelium sodium channel (ENaC). Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface, *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 2743-2749.
- Fuchs W, Larsen EH and Lindemann B. Current-voltage curve of sodium channels and concentration dependence of sodium permeability in frog skin, *Journal of Physiology* 1977; 267(1):137-166.
- Fukuda N, Jayr C, Lazrak A, Wang Y, Lucas R, Matalon S, Matthay MA. Mechanisms of TNF- α stimulation of amiloride-sensitive sodium transport across alveolar epithelium, *American Journal of Physiology, Lung Cellular & Molecular Physiology* 2001; 280(6):L1258-1265.
- Funder JW, Feldman D and Edelman IS. Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid, *Journal of Steroid Biochemistry* 1972; 3:209-218.
- Funder JW, Pearce PT, Smith R. and Smith AI. Mineralocorticoid action: target-tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated, *Science* 1988; 4878: 583-585.
- Geller DS, Rodriguez-Soriano J, Vallo Boado A, Schifter S, Bayer M, Chang SS, Lifton RP. Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type I, *Nature Genetics* 1998; 19(3):279-281.
- Geller DS, Zhang J, Zennaro MC, Vallo-Boado A, Rodriguez-Soriano J, Furu L, Haws R, Metzger D, Botelho B, Karaviti L, Haqq AM, Corey H, Janssens S, Corvol P, Lifton RP. Autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1: mechanisms, evidence for neonatal lethality, and phenotypic expression in adults, *Journal of American Society of Nephrology* 2006; 17(5):1429-1436.

- Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Krug AW, Gekle M. Evidence for epidermal growth factor receptor as negative-feedback control in aldosterone-induced Na⁺ reabsorption, *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 2004; 286(6):F1226-1231.
- Gumz ML, Stow LR, Lynch IJ, Greenlee MM, Rudin A, Cain BD, Weaver DR, Wingo CS. The circadian clock protein Period 1 regulates expression of the renal epithelial sodium channel in mice, *Journal of Clinical Investigation* 2009; 119: 2423-2434.
- Hamm LL, Feng Z, Hering-Smith KS. Regulation of sodium transport by ENaC in the kidney, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*; 2010 19(1):98-105.
- Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, Canessa C, Iwasaki T, Rossier B, Lifton RP. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome, *Nature Genetics* 1995; 11: 76-82.
- Harrap SB, Stebbing M, Hopper JL, Hoang HN, Giles GG. Familial patterns of covariation for cardiovascular risk factors in adults: The Victorian Family Heart Study, *American Journal of Epidemiology* 2000; 152: 704-715.
- Harris M, Firsov D, Vuagniaux G, Stutts MJ, Rossier BC A novel neutrophil elastase inhibitor prevents elastase activation and surface cleavage of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus laevis* oocytes, *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(1):58-64.
- Hazemi P, Tzotzos SJ, Fischer B, Andavan GS, Fischer H, Pietschmann H, Lucas R and Lemmens-Gruber R. Essential structural features of TNF- α lectin-like domain derived peptides for activation of amiloride-sensitive sodium current in A549 cells, *Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 53, 8021–8029.
- Hughey RP, Mueller GM, Bruns JB, Kinlough CL, Poland PA, Harkleroad KL, Carattino MD, Kleyman TR. Maturation of the epithelial Na⁺ channel involves proteolytic processing of the alpha- and gamma-subunits, *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(39):37073-37082.
- Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL and Kleyman TR. Distinct pools of epithelial sodium channels are expressed at the plasma membrane, *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 48491–48494.
- Huppmann S, Lankes E, Schnabel D, Bühner C. Unimpaired postnatal respiratory adaptation in a preterm human infant with a homozygous ENaC- α unit loss-of-function mutation, *J Perinatol* 2011; 31(12):802-803.

- Ichimura T, Yamamura H, Sasamoto K, Tominaga Y, Taoka M, Kakiuchi K, Shinkawa T, Takahashi N, Shimada S, Isobe T. 14-3-3 proteins modulate the expression of epithelial Na⁺ channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase, *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(13):13187-13194.
- Jordan J, Kurschat C and Reuter H. Arterial Hypertension Diagnosis and Treatment, *Deutsches Ärzteblatt* 2018, 115: 557-568.
- Kabra R, Knight KK, Zhou R and Snyder PM. Nedd4-2 induces endocytosis and degradation of proteolytically cleaved epithelial Na⁺ channels, *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283(10):6033-6039.
- Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, Rapson AK, MacGregor GG, Giebisch G, Hebert SC, Lifton RP. WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion, *Nature Genetics* 2003; 35(4):372-376.
- Kanelis V, Farrow NA, Kay LE, Rotin D, Forman-Kay JD. NMR studies of tandem WW domains of Nedd4 in complex with a PY motif-containing region of the epithelial sodium channel, *Biochemistry & Cell Biology* 1998; 76(2-3): 341-350.
- Kanelis V, Rotin D and Forman-Kay JD. Solution structure of a Nedd4 WW domain-ENaC peptide complex, *Nature Structural & Molecular Biology* 2001; 8: 407–412.
- Karpushev AV, Ilatovskaya DV and Staruschenko A. The actin cytoskeleton and small G protein RhoA are not involved in flow-dependent activation of ENaC, *BMC Research Notes* 2010; 3: 210.
- Kashlan OB, Blobner BM, Zuzek Z, Tolino M, Kleyman TR Na⁺ inhibits the epithelial Na⁺ channel by binding to a site in an extracellular acidic cleft, *Journal of Biological Chemistry* 2015; 290:568–576.
- Kellenberger S, Gautschi I and Schild L. A single point mutation in the pore region of the epithelial Na⁺ channel changes ion selectivity by modifying molecular sieving, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1999; 3096:4170-4175.
- Kerem E, Bistrizter T, Hanukoglu A, Hofmann T, Zhou Z, Bennett W, MacLaughlin E, Barker P, Nash M, Quittell L, Boucher R, Knowles MR. Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoaldosteronism, *New England Journal of Medicine* 1999; 341:156–162.
- Khuri RN, Strieder WN and Giebisch G. Effects of flow rate and potassium intake on distal tubular potassium transfer, *American Journal of Physiology* 1975; 228(4):1249-1256.

- Kleyman TR and Cragoe EJ. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport, *Journal of Membrane Biology* 1988; 105: 1-21.
- Knight KK, Wentzlaff DM and Snyder PM. Intracellular sodium regulates proteolytic activation of the epithelial sodium channel, *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283(41):27477-27482.
- Kobayashi T and Cohen P. Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2, *Biochemical Journal* 1999; 339(Pt 2): 319–328.
- Kuhnle U, Nielsen MD, Tietze HU, Schroeter CH, Schlamp D, Bosson D, Knorr D, Armanini D. Pseudohypoaldosteronism in eight families: different forms of inheritance are evidence for various genetic defects, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990; 70(3):638-641.
- Kunau RT, Webb HL and Borman SC. Characteristics of the relationship between the flow rate of tubular fluid and potassium transport in the distal tubule of the rat, *Journal of Clinical Investigation* 1974; 54(6):1488-1495.
- le Noble F, Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Djonov V, Matthijsen R, Bréant C, Fleury V, Eichmann A. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac, *Development* 2004; 131(2):361-375.
- Liddle GW, Bledsoe T and Coppage WSJ. A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion, *Transactions of the Association of American Physicians* 1963; 76:199-213.
- Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Gutkin M, Fallo F, Gill JR Jr, Feld L, Ganguly A, Laidlaw JC, Murnaghan DJ, Kaufman C, Stockigt JR, Ulick S and Lalouel JM. Hereditary hypertension caused by chimeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase, *Nature Genetics* 1992; 2(1):66-74.
- Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation, *Science* 1996; 3272: 676-680.
- Liu W, Xu S, Woda C, Kim P, Weinbaum S, Satlin LM. Effect of flow and stretch on the $[Ca^{2+}]_i$ response of principal and intercalated cells in cortical collecting duct, *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 2003; 285(5):F998-F101.

- Lucas R, Magez S, De Leys R, Fransen L, Scheerlinck JP, Rampelberg M, Sablon E, De Baetselier P. Mapping the lectin-like activity of tumor necrosis factor, *Science* 1994; 263(5148):814-817.
- McDonald FJ, Snyder PM, McCray PB, and Welsh MJ. Cloning, expression, and tissue distribution of a human amiloride-sensitive Na⁺ channel, *The American Journal of Physiology* 1994; 266:L728–L734.
- Melzi ML, Guez S and Sersale G. Acute pyelonephritis as a cause of hyponatremia/hyperkalemia in young infants with urinary tract malformations, *The Pediatric Infectious Disease Journal* 1995; 14(1):56-59.
- Mironova E, Bugaj V, Roos KP, Kohan DE, Stockand JD. Aldosterone-independent regulation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by vasopressin in adrenalectomized mice, *Proceedings of the National Academy of the Sciences USA* 2012; 109:10095-100100.
- Molloy SS, Bresnahan PA, Leppla SH, Klimpel KR, Thomas G Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen, *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(23):16396-16402.
- Molloy SS, Thomas L, VanSlyke JK, Stenberg PE, Thomas G. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface, *EMBO Journal* 1994; 13(1):18-33.
- Morimoto T, Liu W, Woda C, Carattino MD, Wei Y, Hughey RP, Apodaca G, Satlin LM, Kleyman TR. Mechanism underlying flow stimulation of sodium absorption in the mammalian collecting duct, *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 2006; 291(3):F663-669.
- Ma HP, Li L, Zhou ZH, Eaton DC, Warnock DG. ATP masks stretch activation of epithelial sodium channels in A6 distal nephron cells, *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 2002; 282(3):F501-505.
- Mueller GM, Maarouf AB, Kinlough CL, Sheng N, Kashlan OB, Okumura S, Luthy S, Kleyman TR, Hughey RP. Cys palmitoylation of the beta subunit modulates gating of the epithelial sodium channel, *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285(40):30453-30462.
- Mukherjee A, Mueller GM, Kinlough CL, Sheng N, Wang Z, Mustafa SA, Kashlan OB, Kleyman TR, Hughey RP. Cysteine palmitoylation of the γ subunit has a dominant role in modulat-

- ing activity of the epithelial sodium channel, *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289(20): 14351–14359.
- Muller OG, Parnova RG, Centeno G, Rossier BC, Firsov D, Horisberger JD. Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺, *Journal of American Society of Nephrology* 2003; 14(5):1107-1115.
- Náray-Fejes-Tóth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G and Fejes-Tóth G. *sgk* is an Aldosterone-induced Kinase in the Renal Collecting Duct, effects on epithelial Na⁺ channels, *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(24):16973-16978.
- Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M, Miyoshi T, Iwashita K, Shiraishi N, Nonoguchi H, Chen LM, Chai KX, Chao J, Tomita K Regulation of prostasin by aldosterone in the kidney, *Journal of Clinical Investigation* 2002; 109(3):401-408.
- Noreng S, Bharadwaj A, Posert R, Yoshioka C and Baconguis I. Structure of the human epithelial sodium channel by cryo-electron microscopy, *eLife* 2018; e39340.
- North TE, Goessling W, Peeters M, Li P, Ceol C, Lord AM, Weber GJ, Harris J, Cutting CC, Huang P, Dzierzak E, Zon LI. Hematopoietic stem cell development is dependent on blood flow, *Cell* 2009; 137(4):736-748.
- Ohno Y, Kihara A, Sano T, Igarashi Y. Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins, *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1761(4):474-483.
- Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cifková R, Dominiczak AF, Grassi G, Jordan J, Poulter NR, Rodgers A and Whelton PK. Hypertension, *Nature Reviews Disease Primers* 2018; 4: 18014.
- Orce GG, Castillo GA and Margolius HS. Inhibition of short-circuit current in toad urinary bladder by inhibitors of glandular kallikrein, *American Journal of Physiology* 1980; 239:F459–F465.
- Park J, Leong ML, Buse P, Maiyar AC, Firestone GL, Hemmings BA. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway, *EMBO Journal* 1999; 18(11):3024-3033.
- Pickering GW. The genetic factor in essential hypertension, *Annals of Internal Medicine* 1955; 51:5-11.

- Pochynyuk O, Tong Q, Medina J, Vandewalle A, Staruschenko A, Bugaj V, Stockand JD. Molecular Determinants of PI(4,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃ Regulation of the Epithelial Na⁺ Channel, *Journal of General Physiology* 2007; 130(4):399-413.
- Pochynyuk O, Bugaj V, Vandewalle A and Stockand JD. Purinergic control of apical plasma membrane PI(4,5)P₂ levels sets ENaC activity in principal cells, *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 2008; 294(1):F38-46.
- Porter GA, Bogoroch R and Edelman IS. On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport: the role of RNA synthesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1964; 52: 1326–1333.
- Riepe FG, Finkeldei J, de Sanctis L, Einaudi S, Testa A, Karges B, Peter M, Viemann M, Grotzinger J, Sippell WG, Fejes-Toth G, Krone N. Elucidating the underlying molecular pathogenesis of NR3C2 mutants causing autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006; 91(11):4552-4561.
- Rossier BC and Palmer LG. Mechanisms of aldosterone action on sodium and potassium transport. The Kidney, Physiology and Pathophysiology, *Raven Press, New York* 1992; 313: 1045-1056.
- Rotin D and Staub O. Role of the ubiquitin system in regulating ion transport, *Pflugers Archiv* 2011; 461(1):1-21.
- Ruffieux-Daidié D, Poirot O, Boulkroun S, Verrey F, Kellenberger S, Staub O. Deubiquitylation regulates activation and proteolytic cleavage of ENaC, *Journal of American Society of Nephrology* 2008; 19(11):2170-2180.
- Sartorato P, Lapeyraque AL, Armanini D, Kuhnle U, Khaldi Y, Salomon R, Abadie V, Di Battista E, Naselli A, Racine A, Bosio M, Caprio M, Poulet-Young V, Chabrolle JP, Niaudet P, De Gennes C, Lecornec MH, Poisson E, Fusco AM, Loli P, Lombes M, Zennaro MC. Different inactivating mutations of the mineralocorticoid receptor in fourteen families affected by type 1 pseudohypoaldosteronism, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88(6):2508-2517.
- Satlin LM, Sheng S, Woda CB and Kleyman TR. Epithelial Na(+) channels are regulated by flow, *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 2001; 280(6):F1010-1018.
- Schild L, Lu Y, Gautschi I, Schneeberger E, Lifton RP, Rossier BC. Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome, *EMBO Journal* 1996; 15(10):2381-2387.

- Schild L, Schneeberger E, Gautschi I and Firsov D. Identification of Amino Acid Residues in the α , β , and γ Subunits of the Epithelial Sodium Channel (ENaC) Involved in Amiloride Block and Ion Permeation, *Journal of General Physiology* 1997; 109: 15-26.
- Schmidt JW and Catterall WA. Palmitoylation, sulfation, and glycosylation of the alpha subunit of the sodium channel. Role of post-translational modifications in channel assembly, *Journal of Biological Chemistry* 1987; 262(28):13713-13722.
- Schmidt MF and Schlesinger MJ. Fatty acid binding to vesicular stomatitis virus glycoprotein: a new type of post-translational modification of the viral glycoprotein, *Cell* 1979; 17(4):813-819.
- Shabbir W, Scherbaum-Hazemi P, Tzotzos S, Fischer B, Fischer H, Pietschmann H, Lucas R, Lemmens-Gruber R. Mechanism of action of novel lung edema therapeutic AP301 by activation of the epithelial sodium channel, *Molecular Pharmacology* 2013; 84(6):899-910.
- Sheng S, Carattino MD, Bruns JB, Hughey RP, Kleyman TR. Furin cleavage activates the epithelial Na^+ channel by relieving Na^+ self-inhibition, *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 2006; 290(6):F1488-1496.
- Sheng S, Perry CJ and Kleyman TR. Extracellular Zn^{2+} activates epithelial Na^+ channels by eliminating Na^+ self-inhibition, *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(30):31687-96.
- Sherblom AP, Decker JM and Muchmore AV. The lectin-like interaction between recombinant tumor necrosis factor and uromodulin, *Journal of Biological Chemistry* 1988; 263(11):5418-5424.
- Shi S, Blobner BM, Kashlan OB, Kleyman TR. Extracellular finger domain modulates the response of the epithelial sodium channel to shear stress, *Journal of Biological Chemistry* 2012; 287(19): 15439–15444.
- Shi S, Ghosh DD, Okumura S, Carattino MD, Kashlan OB, Sheng S, Kleyman TR Base of the thumb domain modulates epithelial sodium channel gating, *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286(17): 14753–14761.
- Shi HK, Asher C, Chigaev A, Yung Y, Reuveny E, Seger R, and Garty H. Interactions of β and γ ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation, *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(16):13539-13547.
- Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr, Ulick S, Milora RV, Findling JW. Liddle's syndrome: heritable human hypertension

- caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel, *Cell* 1994; 79(3):407-414.
- Snyder PM, Olson DR and Bucher DB. A pore segment in DEG/ENaC Na(+) channels, *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 28484-28490.
- Snyder PM, Bucher DB and Olson DR. Gating induces a conformational change in the outer vestibule of ENaC, *Journal of General Physiology* 2000; 116(6):781-790.
- Snyder PM, Olson DR, Kabra R, Zhou R and Steines JC. cAMP and serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) regulate the epithelial Na(+) channel through convergent phosphorylation of Nedd4-2, *Journal of Biological Chemistry* 2004a; 279(44):45753-45758.
- Snyder PM, McDonald FJ, Stokes JB, Welsh MJ. Membrane topology of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel, *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:24379-24383.
- Soundararajan R, Melters D, Shih IC, Wang J, Pearce D. Epithelial sodium channel regulated by differential composition of a signaling complex, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2009; 106(19):7804-7809.
- Sprang SR and Eck MJ. The 3D structure of TNF. Tumor Necrosis Factors: The Molecules and Their Emerging Role in Medicine, *New York: Raven* 1992; p. 11–32.
- Staub O, Dho S, Henry P, Correa J, Ishikawa T, McGlade J, Rotin D. WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome, *EMBO Journal* 1996; 15(10): 2371-2380.
- Stokes JB. Disorders of the epithelial sodium channel: Insights into the regulation of extracellular volume and blood pressure, *Kidney International* 1999; 56: 2318–233.
- Taschenatlas der Pathophysiologie, 2. korrigierte Auflage 2005
- Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD and Rossier BC. An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel, *Nature* 1997; 389:607–610.
- Vehaskari VM, Hering-Smith KS, Moskowitz DW, Weiner ID, and Ham LL. Effect of epidermal growth factor on sodium transport in the cortical collecting tubule, *American Journal of Physiology, Renal Fluid Electrolyte Physiology* 1989; 256(5 Pt 2):F803-809.
- Veríssimo F and Jordan P. WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms, *Oncogene* 2001; 20(39):5562-5569.
- Verrey F and Wang J. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1999; 96(5): 2514–2519.

- Verrey F. Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport, *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 1999; 277(3): F319-F327.
- von Heijne G. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule, *Journal of Molecular Biology* 1992; 202: 487-494.
- Vuagniaux G, Vallet V, Jaeger NF, Hummler E, Rossier BC Synergistic activation of ENaC by three membrane-bound channel-activating serine proteases (mCAP1, mCAP2, and mCAP3) and serum- and glucocorticoid-regulated kinase (Sgk1) in *Xenopus* Oocytes, *Journal of General Physiology* 2002; 120:191–201.
- Wakida N, Kitamura K, Tuyen DG, Maekawa A, Miyoshi T, Adachi M, Shiraishi N, Ko T, Ha V, Nonoguchi H, Tomita K. Inhibition of prostasin-induced ENaC activities by PN-1 and regulation of PN-1 expression by TGF-beta1 and aldosterone, *Kidney International* 2006; 70(8):1432-1438.
- Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Voilley N., and Lazdunski M. Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na⁺ channel, *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 27411-27414.
- Wang EC, Lee JM, Johnson JP, Kleyman TR, Bridges R, Apodaca G. Hydrostatic pressure-regulated ion transport in bladder uroepithelium, *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 2003; 285(4):F651-663.
- Wettstein A. Advances in the field of adrenal cortical hormones, *Experientia* 1954; 10: 397-416.
- WHO. The World Health Report, 2002: reducing risks, promoting healthy life. World Health Organization, Geneva 2002, United States Renal Data System, 1999 Annual Data Report.
- Willam A, Aufy M, Tzotzos S, Evanzin H, Chytrcek S, Geppert S, Fischer B, Fischer H, Pietschmann H, Czikora I, Lucas R, Lemmens-Gruber R, Shabbir W. Restoration of epithelial sodium channel function by synthetic peptides in pseudohypoaldosteronism type 1B mutants, *Frontiers in Pharmacology* 2017; 8:85.
- Willam A, Aufy M, Tzotzos S, El-Malazi D, Poser F, Wagner A, Unterköfler B, Gurmani D, Martan D, Iqbal SM, Fischer B, Fischer H, Pietschmann H, Czikora I, Lucas R, Lemmens-Gruber R and Shabbir W. TNF lectin-like Domain restores epithelial sodium channel Function in Frameshift Mutants associated with Pseudohypoaldosteronism Type 1B, *Frontiers in Immunology* 2017; 8:601.

Zennaro MC and Lombes M. Mineralocorticoid resistance, *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2004; 15(6):264-270.

Zhang W, Xia X, Reisenauer MR, Rieg T, Lang F, Kuhl D, Vallon V, Kone BC Aldosterone-induced Sgk1 relieves Dot1a-Af9-mediated transcriptional repression of epithelial Na⁺ channel alpha, *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 773-783.

ABBILDUNGEN

Abbildung 1 und 2: Noreng S, Baconguis I, Bharadwaj A, Posert R and Yoshioka C

Structure of the human epithelial sodium channel by cryo-electron microscopy, *eLife* 2018; e39340.

Abbildung 3: Hamm LL, Feng Z and Hering-Smith KS

Regulation of sodium transport by ENaC in the kidney, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2010; 19:98–105.

Abbildung 4: Soundararajan R, Hughey RP, Kleyman TR and Pearce D

Role of epithelial sodium channels and their regulators in hypertension, *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285:30363–30369.

Abbildung 5: Kleyman TR, Carattino MD and Hughey RP

ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284:20447–20451.

Abbildung 6: Willam A, Aufy M, Chytrcek S, Czikora I, Evanzin H, Fischer B, Fischer

H, Geppert S, Lemmens-Gruber R, Lucas R, Pietschmann H, Shabbir W and Tzotzos S
Restoration of epithelial sodium channel function by synthetic peptides in pseudohypoaldosteronism type 1B mutants, *Frontiers in Pharmacology* 2017; 8:85.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.