

Justus-Liebig Universität Gießen, Fachbereich 08: Biologie und Chemie
Institut für Tierphysiologie, AG Molekulare Zellphysiologie
Prof. Dr. W. Claus

**Die Beteiligung der Extrazellulären Matrix
an der Mechanosensitivität des
humanen Epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC)**

**Inauguraldissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (*Dr. rer. nat.*)**

Vorgelegt von

Fenja Knöpp

aus Wölfersheim/Melbach

Dezember 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Clauss
2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Diener

Für
Neße Marie und Yascha

Inhalt

Zusammenfassung	VIII
Summary	X
I Einleitung	1
1 Ionen und Ionenkanäle	1
2 Die DEG/ENaC-Superfamilie	2
3 Der epitheliale Na⁺-Kanal (ENaC)	4
3.1 Struktureller Aufbau	4
3.2 Vorkommen und physiologische Funktion des ENaC	5
3.2.1 Die Rolle des ENaC in der Lunge	6
3.2.2 Der ENaC in der Niere	7
3.3 Mechanische Regulation des ENaC durch Scherkraft	9
3.3.1 Physiologische Bedeutung der ENaC-Mechanosensitivität	10
3.3.2 Mechanismus der Scherkraft-Wahrnehmung	11
3.4 Ziele der Dissertation	15
II Material und Methoden	16
1 Xenopus laevis	16
1.1 Systematische Einordnung	16
1.2 Vorkommen und Morphologie	16
1.3 Tierhaltung	17
2 Die Oozyten des Xenopus laevis	17
2.1 Morphologie	18
2.2 Xenopus Oozyten als heterologes Expressionssystem	19
2.3 Entnahme und Präparation der Oozyten	20
2.3.1 Lösungen zur Präparation der Oozyten	21
2.4 Degradierung der Extrazellulären Matrix von Xenopus Oozyten	22
2.4.1 Mechanische Devitellinisierung	22
2.4.2 Versuchsablauf zur Bestimmung des Scherkraft-Effektes nach Devitellinisierung	23
2.4.3 Enzymatischer Abbau der Extrazellulären Matrix	24
2.4.4 Versuchsablauf zur Charakterisierung des SK-Effektes nach enzymatischem Abbau der Extrazellulären Matrix	25
3 Molekularbiologie	27
3.1 Herstellung der cRNA	27
3.1.1 Der Expressions-Vektor	27
3.1.2 Amplifikation der Plasmid-DNA	28
3.1.3 Plasmidpräparation	28
3.1.4 Linearisierung der Plasmid-DNA	29
3.1.5 Phenol/Chloroform-Extraktion	29
3.1.6 Ethanol-Präzipitation	30
3.1.7 Überprüfung der Linearisierung mittels Agarose-Gelelektrophorese	31
3.1.8 <i>in vitro</i> Transkription	31
3.1.9 Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung der Transkription	33
3.1.10 Mikroinjektion der cRNA in Xenopus Oozyten	34

3.2 Zielgerichtete Mutagenese der α - und δ -ENaC-Untereinheit	35
3.2.1 Mutagenese-PCR	36
3.3 Nachweis der Glykosylierung des α ENaC mittels Western Blot	40
3.3.1 Lyse der Oozyten zur Proteingewinnung	41
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay	42
3.3.3 Enzymatische Behandlung mit PNGase F und Hyaluronidase	43
3.3.4 Probenvorbereitung und Gel-Auftrag	46
3.3.5 SDS-PAGE	46
3.3.6 Western Blot	48
3.3.7 Verwendete Lösungen für den Western Blot	49
4 Elektrophysiologie	52
4.1 Das Prinzip der Spannungsklemme	52
4.2 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	53
4.2.1 Aufbau der verwendeten Messapparatur	53
4.2.2 Herstellung Mikroelektroden	54
4.2.3 Die Messkammer	54
4.2.4 Berechnung von Scherkräften	56
4.2.5 Berechnung des Scherkraft-Effekts (SK-Effekt)	57
4.2.6 Lösungen für TEVC-Messungen	58
4.2.7 Vorzeichenkonvention	58
4.2.8 Statistik	58
4.3 Die <i>Patch Clamp</i> -Technik	59
4.3.1 Das Messprinzip der <i>Patch Clamp</i> -Technik	59
4.3.2 <i>Patch</i> -Konfigurationen	61
4.3.3 Der Messaufbau	62
4.3.4 Herstellung der Messelektroden	62
4.3.5 Versuchsablauf	63
4.3.6 Lösungen für <i>Patch Clamp</i> -Messungen	64
4.3.7 Auswertung der Messdaten	65
4.3.8 Vorzeichenkonvention	67
5 Homologie-Modelling zur Vorhersage der 3D-Struktur des α- und δ1ENaC	67
III Ergebnisse	69
1 Scherkräfte aktivieren den humanen ENaC	69
1.1 Der Einfluss von SK auf den $\alpha\beta\gamma$ ENaC	70
1.1.1 Kontroll-Messungen	71
1.2 $\delta\beta\gamma$ ENaC	73
1.2.1 Kontroll-Messungen	75
2 Charakterisierung des SK-Effektes	78
2.1 Reversibilität	78
2.1.1 $\alpha\beta\gamma$ ENaC	78
2.1.2 $\delta\beta\gamma$ ENaC	79
2.2 Dosisabhängigkeit des SK-Effektes	81
2.2.1 $\alpha\beta\gamma$ ENaC	81
2.2.2 $\delta\beta\gamma$ ENaC	83

3 Einfluss der Extrazellulären Matrix auf den SK-Effekt	84
3.1 Degradierung der Extrazellulären Matrix	84
3.1.1 Rasterelektronenmikroskopischer Nachweis zur Degradierung der Extrazellulären Matrix	84
3.1.2 Charakterisierung des SK-Effekts bei degradiertem Extrazellulärer Matrix	86
3.1.3 Die Komponenten der Extrazellulären Matrix beeinflussen den SK-Effekt des $\delta\beta\gamma$ ENaC nicht	90
3.2 Akuter Effekt von Hyaluronidase auf den ENaC	91
3.2.1 $\alpha\beta\gamma$ ENaC	91
3.2.2 $\delta\beta\gamma$ ENaC	95
4 Verknüpfungsstellen zwischen $\alpha\beta\gamma$ENaC und Extrazellulärer Matrix	98
4.1 Charakterisierung der Asparagin-Mutanten	100
4.1.1 SK-Effekt	100
4.1.2 Der Einfluss von Hyaluronidase auf den ΔI_{ENaC} der Asparagin-Mutanten	101
4.1.3 Amilorid-Bindeaffinität	103
4.2 Generierung und Charakterisierung von Doppel-, bzw. Dreifach-Mutanten	105
4.3 Theoretisches Strukturmodell des α ENaC zur Lokalisation der Asparagine 312 und 511	108
4.3.1 Lokalisierung der Asparagine 232, 293 und 397 in der 3D-Struktur	111
4.4 Western Blot zum Nachweis des Glykosylierungsstatus der α ENaC-Untereinheit	112
4.5 Charakterisierung der SK-insensitiven α ENaC-Doppel-Mutante N312+511A	115
4.5.1 Vergleich des ΔI_{ENaC} in Ab- und Anwesenheit von Scherkräften	115
4.5.2 Charakteristika der Doppel-Mutante auf Einzelkanalebene	117
5 Substitution von Asparaginen in der Extrazellulären Domäne des $\delta 1$ENaC	120
IV Diskussion	123
1 Der ENaC als Mechanosensor	123
2 Der molekulare Aufbau des ENaC	124
2.1 Die Stöchiometrie des ENaC	124
2.2 Die Topologie der ENaC-Untereinheiten	125
2.2.1 Die Extrazellulären Domänen	126
2.3 Die Beeinflussung des <i>gatings</i> durch SK	127
3 Die Extrazelluläre Matrix als SK-Sensor	128
4 Die Beteiligung der Extrazellulären Matrix am SK-Effekt des ENaC	130
4.1 Die Extrazelluläre Matrix von <i>Xenopus</i> Oozyten	130
4.2 Der Einfluss der Vitellinhülle auf den SK-Effekt	131
4.3 Elastin ist nicht an der SK-Wahrnehmung des ENaC beteiligt	132
4.4 Der SK-Effekt nach Hyaluronidase-vermittelter Degradierung der Extrazellulären Matrix	132
4.4.1 Der Effekt von Hyaluronidase auf die Mechanosensitivität des $\alpha\beta\gamma$ ENaC	133
4.4.2 Die Mechanosensitivität des $\delta\beta\gamma$ ENaC wird nicht über Hyaluronidase-sensitive Komponenten der Extrazellulären Matrix vermittelt	135
5 Verknüpfungspunkte zwischen ENaC und Extrazellulärer Matrix	135
5.1 Die Mechanosensitivität des $\delta\beta\gamma$ ENaC wird nicht über eine N-glykosidische Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix vermittelt	136
5.2 Glykosylierte Asparagine der <i>knuckle</i> und <i>palm</i> -Domäne der α -Untereinheit sind an der SK-Detektion des $\alpha\beta\gamma$ ENaC beteiligt.	137

6 Die Mechanosensitivität des $\alpha\beta\gamma$ENaC vs. $\delta\beta\gamma$ENaC	139
7 Schlussfolgerung und Ausblick	141
<i>V Anhang</i>	143
1 Literaturverzeichnis	143
2 Abbildungsverzeichnis	159
3 Tabellenverzeichnis	161
4 Sequenzen und <i>Alignments</i>	162
4.1 α ENaC human (Wildtyp)	162
4.2 α ENaC Asparagin-Mutanten	163
4.3 HA- α ENaC human (C-Terminus, Wildtyp)	170
4.4 HA- α ENaC Asparagin-Mutanten	170
4.5 δ 1ENaC human (Wildtyp)	172
4.6 δ 1ENaC Asparagin-Mutanten	172
5 Abkürzungsverzeichnis	174
5.1 Allgemeine Abkürzungen	174
5.2 Größenordnungen	177
5.3 Einheiten	178
6 Verwendete Chemikalien/Pharmaka und deren Bezugsquellen	179
<i>Danksagung</i>	181
<i>Selbstständigkeitserklärung</i>	183

Zusammenfassung

Der aus drei Untereinheiten ($\alpha\beta\gamma$ oder $\delta\beta\gamma$) zusammengesetzte epitheliale Na^+ -Kanal (ENaC) wird sowohl in epithelialen (z.B. der Niere) als auch nicht-epithelialen Zellen (u.a. im Endothel) exprimiert. Seine Aktivität wird neben einer Vielzahl von Faktoren durch Scherkraft reguliert. Diese entsteht z.B. durch den Fluss des Primärharns in der Niere oder den Blutstrom im Gefäßsystem und gilt als adäquater Reiz zur Aktivierung des ENaC. Obwohl die Mechanosensitivität des ENaC damit für essentielle physiologische Prozesse - wie die Blutdruckregulation - von Bedeutung sein könnte, ist der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der Scherkraft-Detektion durch den ENaC bisher nicht bekannt. Die Aufklärung dieses Mechanismus war Gegenstand der vorliegenden Dissertation. Die Untersuchungen basierten auf der Hypothese, dass die großen Extrazellulären Domänen der ENaC-Untereinheiten innerhalb der Extrazellulären Matrix verankert sind. Sollte solch eine Verankerung notwendig für die Scherkraft-Detektion des ENaC sein, dann sollte sowohl der Abbau der Extrazellulären Matrix, als auch der Verlust der Anknüpfungsstellen zwischen ENaC und Extrazellulärer Matrix, zu einer reduzierten Scherkraft-vermittelten Aktivierung des ENaC (im Vergleich zur Kontrolle; intakte Extrazelluläre Matrix bzw. Verknüpfung) führen.

Um dies zu überprüfen, wurden der humane $\alpha\beta\gamma$ - und $\delta\beta\gamma$ ENaC heterolog in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* exprimiert, Scherkraft in physiologisch relevanten Größenordnungen (von 0,001 bis $1,3 \text{ dyn/cm}^2$) ausgesetzt und der daraus resultierende Anstieg des ENaC-vermittelten Stromes (SK-Effekt) mittels der *two-electrode-voltage-clamp* (TEVC)-Technik bestimmt. Beide Kanäle konnten durch Scherkraft repetitiv und dosisabhängig aktiviert werden. Der SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC war jedoch - bei gleicher Scherkraft-Rate - jeweils deutlich stärker und im Gegensatz zum SK-Effekt des $\delta\beta\gamma$ ENaC vollständig reversibel.

Die Beteiligung der Extrazellulären Matrix an der Scherkraft-Detektion wurde untersucht, indem diese mechanisch (Devitellinisierung) und/oder enzymatisch (Elastase, bzw. Hyaluronidase) abgebaut wurde. Die erfolgreiche Degradierung, bzw. Reduktion der Extrazellulären Matrix wurde daraufhin mittels Rasterelektronenmikroskopie überprüft. Der SK-Effekt des in diesen Oozyten exprimierten ENaC wurde anschließend mit demjenigen von unbehandelten (Kontroll)-Oozyten verglichen. Während so weder eine Beteiligung der Vitellinhülle, noch des Strukturproteins Elastin am SK-Effekt nachgewiesen werden konnte, verringerte sowohl eine Inkubation devitellinierter Oozyten in Hyaluronidase, als auch die akute Zugabe dieses Enzyms den SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC. Die Zugabe von Hyaluronidase induzierte zudem eine unmittelbare Abnahme des ENaC-vermittelten Stromes, welche mutmaßlich auf den Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix und damit den Verlust der SK-vermittelten Aktivierung

zurückzuführen war. So konnte erstmals eine Beteiligung der Extrazellulären Matrix an der Scherkraft-Detektion des $\alpha\beta\gamma$ ENaC nachgewiesen werden.

Eine identische Behandlung $\delta\beta\gamma$ ENaC-exprimierender Oozyten mit Hyaluronidase beeinflusste den SK-Effekt dieses Kanals nicht. Dies implizierte, dass potentielle Verknüpfungspunkte des ENaC zur Extrazellulären Matrix in der α -, bzw. δ -Untereinheit lokalisiert sein müssten (da β und γ bei beiden Kanälen identisch waren).

Um mögliche Verknüpfungspunkte der α -, bzw. δ -Untereinheit zur Extrazellulären Matrix zu lokalisieren, wurden mutmaßlich glykosylierte Asparagine, die über angehängte Zuckerketten eine Verbindung zur Extrazellulären Matrix aufbauen könnten, mittels zielgerichteter Mutagenese durch Alanine substituiert. Diese Asparagin-Mutanten wurden (mit β und γ) in Oozyten exprimiert und ihr SK-Effekt mit demjenigen des jeweiligen Wildtyp-ENaC ($\alpha\beta\gamma$ oder $\delta\beta\gamma$) verglichen. Für die δ -Untereinheit konnte auf diese Weise keine für die Scherkraft-Detektion notwendige Verbindung zur Extrazellulären Matrix nachgewiesen werden. Demgegenüber wurden innerhalb der α -Untereinheit zwei Asparagine (N312 und N511) identifiziert, die über ihre Glykosylierung eine für die Scherkraft-Detektion notwendige Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix ausbilden, da der SK-Effekt der Einzel-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermindert und bei gleichzeitiger Mutation beider Asparagine (Doppel-Mutante α N312+511A $\beta\gamma$) weiter reduziert war. Der reduzierte Glykosylierungsstatus der Asparagin-Mutanten wurde mittels Western Blot nachgewiesen, die genaue Position und Orientierung der Asparagine innerhalb der Proteinstruktur mittels *Homologie-Modelling* visualisiert. Mit Hilfe von Einzelkanal-Ableitungen konnte zudem demonstriert werden, dass die im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Glykosylierung der Doppel-Mutante keinen Einfluss auf die Einzelkanaleigenschaften (Leitfähigkeit, Strom-Amplituden bzw. Offenwahrscheinlichkeit) hatte. Auch eine beeinträchtigte Expression der Doppel-Mutante konnte ausgeschlossen werden, da sich die Höhe des ENaC-vermittelten Stromes in Abwesenheit von Scherkraft nicht von dem des Wildtyps unterschied. Dies deutete auf eine vergleichbare Anzahl aktiver Kanäle auf der Zelloberfläche hin.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass sowohl $\alpha\beta\gamma$ - als auch $\delta\beta\gamma$ ENaC mechanosensitive Kanäle bilden, die SK-vermittelte Aktivierung des $\delta\beta\gamma$ ENaC jedoch vermutlich nicht über eine Verknüpfung der δ -Untereinheit mit der Extrazellulären Matrix erfolgt. Für den $\alpha\beta\gamma$ ENaC konnte hingegen nicht nur die zentrale Bedeutung der Extrazellulären Matrix in Bezug auf die Mechanosensitivität dieses Kanals, sondern auch die Existenz und detaillierte Lokalisation der Verbindungsstellen zwischen α -Untereinheit und Extrazellulärer Matrix nachgewiesen werden. Auf diese Weise konnte erstmals der zugrunde liegende molekulare Mechanismus der Scherkraft-Detektion des $\alpha\beta\gamma$ ENaC - zumindest im *Xenopus* Oozyten Expressionsmodell - identifiziert und charakterisiert werden.

Summary

The epithelial Na⁺-channel (ENaC) is composed of three homologous subunits (either α or δ in combination with β and γ) and expressed in both epithelial (e.g. in the kidney) and non-epithelial cells (e.g. endothelial cells). Amongst various factors, ENaC activity is regulated by shear force. Shear force (SF) is elicited e.g. by the urinary flow in the kidney or the bloodstream within the vascular system, and is regarded as suitable stimuli for the activation of ENaC. Although the mechanosensitivity of ENaC could therefore be involved in the regulation of distinct physiological processes such as regulation of blood pressure, the underlying molecular mechanism of SF-sensing by ENaC is yet unknown. The aim of the present dissertation was to characterize this mechanism. It was hypothesized that the large extracellular domains of ENaC are anchored to the extracellular matrix. If either intact extracellular matrix or linkage between ENaC and extracellular matrix were necessary for shear force sensing of ENaC, both the degradation of the extracellular matrix and a disrupted linkage should result in a lowered shear force-induced activation of ENaC compared to control.

To this end, human $\alpha\beta\gamma$ - and $\delta\beta\gamma$ ENaC were heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes and subjected to shear forces in physiological relevant ranges (from 0.001 to 1.3 dyn/cm²). The shear force-induced increase of ENaC-mediated current (SF-effect) was determined by the *two-electrode voltage-clamp technique* (TEVC). Both channels ($\alpha\beta\gamma$ and $\delta\beta\gamma$) were repetitively and dose-dependently activated by shear force. At identical shear force rates, the SF-effect of $\alpha\beta\gamma$ ENaC was significantly stronger than that of $\delta\beta\gamma$ ENaC and completely reversible as opposed to the SF-effect of $\delta\beta\gamma$ ENaC.

The impact of extracellular matrix in SF-sensing of ENaC was examined by its mechanical (devitellinization) and/or enzymatic (elastase and hyaluronidase, respectively) degradation. The degradation of the extracellular matrix was further confirmed by *scanning electron microscopy*. SF-effect of ENaC, expressed in these oocytes upon either mechanical or enzymatic treatment, was determined and compared to those of untreated (control) oocytes. Neither the vitelline envelope nor the structural protein elastin was involved in SF-effect of $\alpha\beta\gamma$ and $\delta\beta\gamma$ ENaC. In contrast, both the incubation of devitellinized oocytes as well as the acute treatment with hyaluronidase lowered SF-effect of $\alpha\beta\gamma$ ENaC. Additionally, application of hyaluronidase induced an immediate decrease of ENaC-mediated current which was presumably due to degradation of the extracellular matrix and thus the lack of shear force-mediated ENaC activation. In conclusion, the participation of the extracellular matrix in SF-sensing of $\alpha\beta\gamma$ ENaC has been shown for the first time.

In contrast, identical treatment of $\delta\beta\gamma$ ENaC-expressing oocytes with hyaluronidase failed to impair SF-effect of this channel, implying that putative connection points between ENaC and

extracellular matrix may be localized within the α - or δ -subunit, respectively (since β and γ were identical between both channels).

In general, sugar chains of N-glycosylated asparagines represent suitable linkages of proteins to the extracellular matrix. In order to determine putative connection-points of α - and δ -subunit to the extracellular matrix, presumably glycosylated asparagines within the extracellular domains of α - and δ -subunit were substituted for alanines. These asparagine-mutants were subsequently expressed in combination with β - and γ - subunits in *Xenopus* oocytes and their SF-effect compared to those of wild-type ENaC ($\alpha\beta\gamma$ or $\delta\beta\gamma$). By this approach, no linkage of δ -subunit to the extracellular matrix which would be involved in SF-sensing of $\delta\beta\gamma$ ENaC was detected. In contrast, two asparagines (N312 and N511) within the extracellular domain of the α -subunit were identified whose glycosylation was essential for shear force-dependent activation of $\alpha\beta\gamma$ ENaC - since their glycosylation represent the indispensable connection of $\alpha\beta\gamma$ ENaC to the extracellular matrix. SF-effect of those single-asparagine mutants was significantly reduced with respect to wild-type and further diminished by a combined mutation of both asparagines (double-mutant α N312+511A $\beta\gamma$).

As glycosylation-deficient mutants differ in molecular weight from wild-type, band-shifts were detected in western blots. The detailed localization and orientation of asparagines within the tertiary structure of the α -subunit was explored *via* homology modeling. Single channel recordings in the *cell attached* configuration revealed that single channel properties (conductance, amplitudes and open-probability) of the double-mutant were equal to those of wild-type. Additionally, an impaired membrane expression of the double-mutant was excluded, since ENaC-mediated current did not differ from those of wild-type in the absence of shear force – referring to a comparable number of active channels at the cell-surface.

In conclusion, both $\alpha\beta\gamma$ and $\delta\beta\gamma$ ENaC are mechanosensitive ion channels, but shear force-mediated activation of $\delta\beta\gamma$ ENaC is presumably not dependent on a linkage of the δ -subunit to the extracellular matrix. Moreover, for $\alpha\beta\gamma$ ENaC not only the pivotal role of extracellular matrix in mechanosensitivity of $\alpha\beta\gamma$ ENaC, but also the existence and detailed localization of connection-points to the extracellular matrix were established. Overall, the underlying mechanism of shear force-dependent activation of $\alpha\beta\gamma$ ENaC - at least in the *Xenopus* expression system - was identified and characterized for the first time.

I Einleitung

1 Ionen und Ionenkanäle

Ionen nehmen bei den diversesten physiologischen Prozessen eine Schlüsselrolle ein. So ist beispielsweise die Ausbildung eines Membranpotenzials, welches auf der Ungleichverteilung von Ionen (vorrangig K^+ , Na^+ und Cl^-) und damit elektrischer Ladungen zwischen intra- und extrazellulärem Kompartiment beruht, sowie dessen gezielte und schnelle Veränderung essentiell für die Erregungsleitung in Nerven- und Muskelzellen, sowie die synaptische Signalübertragung zwischen diesen Zellen (Moyes und Schulte 2008). Auch wird durch zielgerichtete Ionentransportprozesse die Aufrechterhaltung der Elektrolyt- und Wasserhomöostase gewährleistet, indem der gezielte Transport von Ionen als osmotische Triebkraft für die Resorption von Wasser genutzt wird (Moyes und Schulte 2008).

Um die für diese Prozesse notwendige Ungleichverteilung der Ionen zwischen dem Zellinneren und dem umgebenden Milieu auszubilden und aufrechtzuerhalten, sind spezielle Mechanismen für den Transfer der Ionen durch die die Zellmembran bildende hydrophobe Lipiddoppelschicht notwendig. Zu diesem Zweck sind spezielle Transportproteine in der Zellmembran eingelagert, welche einen selektiven und geordneten Transport der Ionen und damit die Ausbildung sowohl eines elektrischen als auch eines chemischen Gradienten für diese Teilchen ermöglichen. Von einem elektrischen Gradienten ist immer dann die Rede, wenn geladene Teilchen beiderseits einer Barriere (z.B. der Zellmembran) ungleichmäßig verteilt vorliegen, wohingegen der chemische Gradient ausschließlich auf dem Verhältnis der Konzentrationen eines bestimmten Moleküls zu beiden Seiten der Membran beruht (Moyes und Schulte 2008).

Grundsätzlich wird zwischen zwei unterschiedlichen Klassen von Transportproteinen unterschieden: *Carrier* und Kanalproteinen. *Carrier* binden das zu transportierende Teilchen (z.B. das Ion) auf der einen Seite der Membran, durchlaufen daraufhin eine Konformationsänderung und geben es anschließend auf der entgegengesetzten Seite der Membran wieder ab. Diese Form des Transports kann entweder passiv, d.h. entlang eines Konzentrationsgradienten, oder aber aktiv (entgegen den Gradienten) erfolgen. In diesem Fall wird entweder Energie in Form von ATP verbraucht (primär aktiver Transport) oder es wird die Energie aus dem elektrochemischen Gradienten einer anderen Molekül- oder Ionenart genutzt, um den Transport eines Ions entgegen seines Gradienten anzutreiben (sekundär aktiver Transport).

Die zweite Klasse der Transportproteine bilden die Kanalproteine. Durch sie können in Wasser gelöste Substanzen die Membran passieren. Dienen diese Kanalproteine dem

Transport von kleinen anorganischen Ionen, wie Na^+ , K^+ , Cl^- oder Ca^{2+} , spricht man von sogenannten Ionenkanälen (Moyes und Schulte 2008). Diese Makromoleküle bilden wassergefüllte, hydrophile Poren in der Membran, durch welche die gelösten Ionen passiv, d.h. entlang ihres Gradienten, diffundieren können („erleichterte Diffusion“). Die Triebkraft für den Transport von Ionen durch ihre jeweiligen Ionenkanäle setzt sich aus dem elektrischen und dem chemischen Konzentrationsgradienten zusammen. Ob ein geladenes Teilchen also in die Zelle hinein diffundiert oder aus ihr heraus, hängt dementsprechend ausschließlich von dem für das jeweilige Ion geltenden elektrochemischen Gradienten ab. Ionenkanäle sind dabei meist nur für eine bestimmte Art von Ionen durchlässig. Diese Selektivität richtet sich maßgeblich nach der Ladung des Ions sowie dem Radius seiner Hydrathülle und wird durch den sog. „Selektivitätsfilter“ gewährleistet, einen Strukturbestandteil des Kanals (Moyes und Schulte 2008). Des Weiteren zeichnen sich Ionenkanäle durch eine hohe und modulierbare Leitfähigkeit für ihr Substrat aus (Catterall 1984), d.h. der Kanal kann je nach den erforderlichen Gegebenheiten geöffnet oder geschlossen werden. Das Öffnen, bzw. Schließen des Kanals geht mit einer Konformationsänderung des Ionenkanals einher und wird als *gating* bezeichnet (Penzlin 2005). Das *gating* des Kanals kann dabei sowohl über die Bindung spezifischer Liganden (Ligandengesteuerte Kanäle), spannungsabhängig (Spannungsabhängige Kanäle) oder durch mechanische Stimuli (Mechanosensitive Kanäle) induziert werden. Des Weiteren existieren konstitutiv aktive Kanäle, deren Aktivität den jeweils erforderlichen physiologischen Erfordernissen angepasst wird (Pape *et al.* 2014). Entsprechend ihrer Charakteristika und/oder Sequenzhomologie werden Ionenkanäle in unterschiedliche Familien eingeteilt. Eine dieser Ionenkanal-Familien stellt die Ende der 1980er Jahre entdeckte DEG/ENaC-Superfamilie dar, zu der zahlreiche, spannungsunabhängige Kationen-Kanäle zählen (Kellenberger und Schild 2002). Auf diese Superfamilie soll im Folgenden genauer eingegangen werden, da der in dieser Studie charakterisierte epitheliale Na^+ -Kanal (ENaC) zu dieser Ionenkanal-Familie zählt.

2 Die DEG/ENaC-Superfamilie

Die Mitglieder der DEG/ENaC-Superfamilie zeichnen sich durch ihre hohe Selektivität gegenüber Na^+ -Ionen aus und sind durch das Diuretikum Amilorid, sowie Amilorid-Derivate wie Benzamil oder Phenamil hemmbar (Perry *et al.* 2001). Alle Mitglieder der DEG/ENaC-Familie bestehen aus homo-, bzw. heteromeren Komplexen miteinander verwandter Protein-Untereinheiten, die sich durch hoch konservierte strukturelle Domänen auszeichnen. Diese

sind für die Kontrolle der Kanal-Aktivität essentiell bzw. partizipieren an der Bildung der Pore (Kellenberger und Schild 2002).

Trotz ihrer gemeinsamen Membrantopologie weisen die Mitglieder dieser Familie jedoch nicht nur hinsichtlich ihrer Ionenselektivität und ihrer Affinität für den Blocker Amilorid wesentliche Unterschiede auf, sondern auch bezüglich ihres Öffnungsmechanismus (manche sind konstitutiv aktiv, andere ligandengesteuert oder mechanosensitiv), sowie ihrer Funktion (Alvarez de la Rosa *et al.* 2000). So sind Mitglieder dieser Ionenkanal-Familie in eine Vielzahl unterschiedlichster physiologischer Prozesse, wie der Geschmacksempfindung (Lin *et al.* 1999), Schmerz- und Berührungswahrnehmung, sowie Lernprozessen (Bianchi und Driscoll 2002) oder der Elektrolyt- und Wasserhomöostase (Garty und Palmer 1997) involviert. Diese Vielfältigkeit spiegelt sich auch in ihrem breit gefächerten Expressionsmuster, von Epithelien bis hin zu Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, wieder (Kellenberger und Schild 2002).

Zu den Mitgliedern der DEG/ENaC-Familie zählen unter anderem die namensgebenden Degenerine. Diese sind z.B. in neuronalen Zellen des Nematoden *Caenorhabditis elegans* an der Ausbildung eines Mechanotransduktions-Komplexes zur Berührungswahrnehmung beteiligt (Tavernarakis und Driscoll 1997; Kellenberger und Schild 2002; O'Hagan *et al.* 2004). Aber auch die Peptid-gesteuerten FaNaCh (*FMRFamide peptide-gated Na⁺-channel*), welche in Muskel- und Nervenzellen von Mollusken, wie der gefleckten Weinbergschnecke *Helix aspera*, nachgewiesen wurden (Lingueglia *et al.* 1995), gehören dieser Ionenkanal-Familie an. Ebenfalls der DEG/ENaC-Familie zugehörig sind die ASICs (*acid sensing ion channels*). Diese sowohl im zentralen, als auch im peripheren Nervensystem von Säugetieren exprimierten Protonen-gesteuerten Kationen-Kanäle sind maßgeblich an der Detektion und Transduktion sensorischer Informationen - wie z. B. der Berührungs- und Schmerzwahrnehmung - beteiligt, aber auch in Lernprozesse involviert (Kellenberger und Schild 2002; Bianchi und Driscoll 2002; Krishtal 2003).

Ein weiteres prominentes Mitglied dieser Familie ist der epitheliale Na⁺-Kanal (ENaC). Die Charakterisierung seiner mechanosensitiven Eigenschaften war Gegenstand der vorliegenden Dissertation, weshalb daher im Folgenden detailliert auf diesen Na⁺-Kanal eingegangen werden soll.

3 Der epitheliale Na⁺-Kanal (ENaC)

3.1 Struktureller Aufbau

Der epitheliale Na⁺-Kanal (ENaC) ist ein konstitutiv aktiver Na⁺-Kanal, der sich „klassischerweise“ aus den drei Untereinheiten α , β und γ zusammensetzt (Canessa *et al.* 1994; Bhalla und Hallows 2008). Die einzelnen Untereinheiten bestehen jeweils aus 650 bis 700 Aminosäuren und besitzen auf Proteinebene eine Homologie von $\sim 35\%$ (Rossier *et al.* 2002). Jede Untereinheit weist das für Mitglieder der DEG/ENaC-Familie charakteristische Organisationsmuster auf (siehe Abb. 1), bestehend aus kurzen, intrazellulären N- und C-Termini, zwei Transmembran-Domänen und einer großen und cysteinreichen extrazellulären Domäne, welche $\sim 70\%$ des Proteins ausmacht (Kashlan und Kleyman 2011).

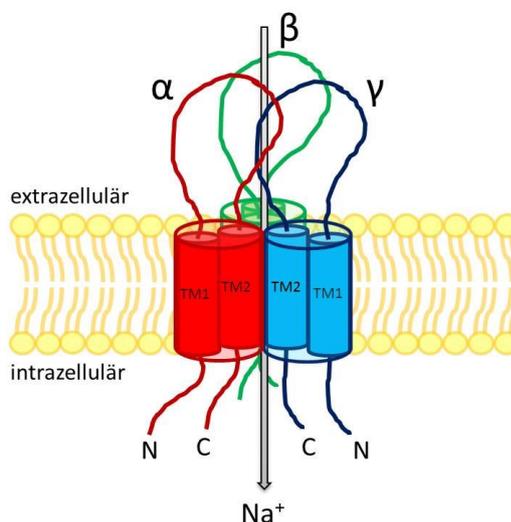


Abb. 1: Schematische Darstellung des epithelialen Na⁺-Kanals

Jede Untereinheit des ENaC (hier α , β und γ) besteht aus intrazellulär lokalisierten N- und C-Termini, zwei Transmembrandomänen (TM1 und TM2), sowie großen Extrazellulären Domänen. Durch ihre Zusammenlagerung wird eine wassergefüllte Pore in der Membran gebildet, durch welche Na⁺-Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten in die Zelle hinein diffundieren können.

Elektrophysiologische Untersuchungen an in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) exprimierten ENaC-Untereinheiten demonstrierten, dass alle drei Untereinheiten in Kombination nötig sind, um eine maximale Na⁺-Transportrate und damit Aktivität des Kanals zu erreichen (Canessa *et al.* 1994). Im Gegensatz zu isoliert exprimierten β - und γ -Untereinheiten ist die α -Untereinheit in der Lage, homomere Kanäle zu formen, welche einen Amilorid-sensitiven Strom vermitteln (Canessa *et al.* 1994). Dieser Strom ist von äußerst geringem Ausmaß, wird aber durch Co-Expression der α -Untereinheit mit β - und γ - um ein vielfaches potenziert (Canessa *et al.* 1994). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde geschlussfolgert, dass die α -Untereinheit die für die Porenbildung essentielle Untereinheit

verkörpert, während β und γ akzessorische Untereinheiten darstellen, welche beispielsweise das *trafficking* (also den Transport des Kanals zur Zellmembran) beeinflussen (Canessa *et al.* 1994; Konstas 2003; Giraldez *et al.* 2007).

Kurz nach der Klonierung des $\alpha\beta\gamma$ ENaC wurde eine vierte, im Menschen und in Primaten vorkommende ENaC-Untereinheit entdeckt - die δ -Untereinheit (Waldmann *et al.* 1995; Giraldez *et al.* 2007). Bisher wurden zwei Isoformen dieser Untereinheit beschrieben ($\delta 1$ und $\delta 2$), welche durch alternatives Spleißen gebildet werden und sich lediglich hinsichtlich der Länge ihres N-Terminus unterscheiden (Giraldez *et al.* 2007; Wesch *et al.* 2012). Von beiden Isoformen nimmt man an, dass sie - ebenso wie die α -Untereinheit - porenbildende Untereinheiten darstellen, da sie sowohl funktionelle homomere, als auch (in Kombination mit der β - und γ -Untereinheit) heteromere Kanäle bilden können (Waldmann *et al.* 1995). Trotz der Tatsache, dass die α - und δ -Untereinheit eine Sequenzhomologie von $\sim 37\%$ aufweisen (Waldmann *et al.* 1995) und einige funktionelle Charakteristika gemeinsam haben, weisen die Kanäle ($\alpha\beta\gamma$ bzw. $\delta\beta\gamma$) doch erhebliche Unterschiede bezüglich ihrer Gewebsverteilung und ihrer Einzelkanal-Eigenschaften auf. So unterscheiden sie sich nicht nur hinsichtlich ihrer Amilorid-Affinität, sondern u.a. auch bezüglich ihrer Öffnungswahrscheinlichkeit, Ionenselektivität, Leitfähigkeit und ihrer Sensitivität gegenüber Protonen (Giraldez 2012).

3.2 Vorkommen und physiologische Funktion des ENaC

Die Existenz des ENaC wurde bereits in Epithelien verschiedenster Organismen nachgewiesen. So wurden Amilorid-sensitive Ströme nicht nur bei Invertebraten, wie dem Blutegel (Weber *et al.* 1993) und der Wollhandkrabbe (Zeiske *et al.* 1992), sondern auch in der Haut (Desmedt *et al.* 1991), der Harnblase (Palmer 1982) und dem Colon (Krattenmacher und Clauss 1988) von Amphibien detektiert und charakterisiert (Palmer 1992; Garty und Palmer 1997). Bei Säugetieren findet man den ENaC u.a. im distalen Nephron der Niere (Palmer und Frindt 1986; Canessa *et al.* 1993), im Colon (Duc *et al.* 1994; Renard *et al.* 1995) und in den Atemwegen (Renard *et al.* 1995; Farman *et al.* 1997). Auch in Ausführungsgängen exokriner Drüsen, wie Speichel- oder Schweißdrüsen (Duc *et al.* 1994; Reddy *et al.* 1999) und in der Haut (Brouard *et al.* 1999; Mauro *et al.* 2002) wurde seine Existenz verifiziert.

In den vergangenen Jahren wurden ENaC-Untereinheiten jedoch zunehmend auch in nicht-epithelialen Zellen detektiert. So wurden sie in Säugetieren etwa in Nervenendigungen von Tastsinnes- (Drummond *et al.* 2000) und Geschmackszellen (Lin *et al.* 1999), im zentralen Nervensystem (Amin *et al.* 2005; Giraldez *et al.* 2007), aber auch in Knochen- (Kizer *et al.* 1997) und Knorpelzellen (La Trujillo *et al.* 1999) nachgewiesen. Nicht zuletzt im vaskulären System, speziell in Barorezeptoren des Aortenbogens und des Karotissinus (Drummond *et al.*

1998; Drummond *et al.* 2001), sowie in glatten Muskelzellen der Blutgefäße (Drummond *et al.* 2004; Drummond *et al.* 2008) und Endothelzellen (Golestaneh *et al.* 2001; Wang *et al.* 2009) wurde die Expression von ENaC-Untereinheiten mittlerweile demonstriert.

Bislang ist über die Rolle des ENaC in diesen nicht-epithelialen Zellen wenig bekannt, wohingegen seine Funktion in Epithelzellen, bzw. epithelialen Geweben bereits eingehend charakterisiert wurde. Hier nimmt der ENaC eine essentielle Rolle bei der Kontrolle der Elektrolyt- und Wasserhomöostase ein, indem er den limitierenden Faktor bei der transepithelialen Na^+ -Resorption darstellt (Garty und Palmer 1997, Kellenberger und Schild 2002). Diese geschieht nach der erstmals von Koefeld und Ussing im Jahre 1953 postulierten „Zwei-Membran-Hypothese“ (Johnsen *et al.* 1953). Hiernach diffundieren Na^+ -Ionen passiv - d.h. auf Grund ihres elektrochemischen Gradienten - durch den in der apikalen Membran lokalisierten ENaC in die Zelle hinein. Das für diese Diffusion notwendige Konzentrationsgefälle wird durch die in der basolateralen Membran lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase generiert, welche aktiv, d.h. unter ATP-Verbrauch, jeweils drei Na^+ -Ionen im Austausch gegen zwei aus dem Extrazellulärraum stammende K^+ -Ionen wieder aus der Zelle herausschleust (Johnsen *et al.* 1953). Auf diese Weise wird die intrazelluläre Na^+ -Konzentration im Verhältnis zum extrazellulären Milieu stets auf einem geringen Niveau gehalten, was ein stetes, passives Nachströmen von Na^+ (durch den ENaC) zur Folge hat. Dieser transepitheliale Na^+ -Transport bildet eine osmotische Triebkraft, welcher Wasser passiv nachfolgt. Auf diese Weise ist der transepitheliale Na^+ -Transport direkt mit der Resorption von Wasser gekoppelt. Die physiologische, aber auch pathophysiologische Relevanz dieses Prozesses soll im Folgenden beispielhaft anhand der ENaC-Aktivität in Lunge und Niere verdeutlicht werden.

3.2.1 Die Rolle des ENaC in der Lunge

In der Lunge ist der ENaC maßgeblich an der Regulation der Quantität und Elektrolytzusammensetzung des Flüssigkeitsfilms beteiligt, welcher das Atemwegs- und Alveolarepithel bedeckt (Hummler *et al.* 1996; Matalon und O'Brodovich 1999; Kellenberger und Schild 2002; Matthay *et al.* 2002; Althaus *et al.* 2011). Dies ist insbesondere in den Alveolen von zentraler Bedeutung, da die Höhe des Flüssigkeitsfilms hier in direktem Zusammenhang mit der Effizienz des Gasaustausches steht (Althaus *et al.* 2011). Die essentielle Rolle des ENaC bei der Regulation des pulmonalen Flüssigkeitsgehaltes wird u.a. während der Geburt von Säugetieren deutlich: Während der Schwangerschaft erfolgt der fetale Gasaustausch ausschließlich über die Plazenta, da die Lunge vollständig mit Flüssigkeit gefüllt ist (Matalon und O'Brodovich 1999). Damit in den Alveolen nach der Geburt ein optimaler

Gasaustausch erfolgen kann, müssen diese jedoch frei von jeglicher Flüssigkeit sein (Matalon und O'Brodovich 1999). Daher muss die Lunge bei der Geburt - und damit dem Übergang zur Luftatmung - möglichst rasch von einem Flüssigkeits-*sekretierenden* zu einem -*absorbierenden* Organ umschalten (Matalon und O'Brodovich 1999). Dies wird über eine verstärkte Na^+ -Resorption über das Alveolarepithel gewährleistet, der Wasser passiv nachströmt (Olver *et al.* 1986, Matalon und O'Brodovich 1999). Bei Studien von Hummler *et al.* im Jahre 1996 wurde die zentrale Bedeutung des ENaC in diesen Zusammenhängen gezeigt: *knock-out* Mäuse, denen die α - Untereinheit des ENaC fehlte, waren nicht in der Lage, die Lungenflüssigkeit zu absorbieren und ertranken kurze Zeit nach der Geburt (Hummler *et al.* 1996; Althaus *et al.* 2011). Ebenso führte der spezifische *knockdown* der α ENaC-Untereinheit mittels siRNA bei Ratten *in vivo* zu einer Reduktion der pulmonalen Na^+ - und damit Wasser-Resorption (Li *et al.* 2006) und unterstreicht die essentielle Rolle des ENaC in diesem als *alveolar fluid clearance* bezeichneten Prozess.

Auch unter pathophysiologischen Gesichtspunkten wird die zentrale Rolle des ENaC in der Lunge deutlich. Ein vermehrter Eintritt von Flüssigkeit in den Alveolarraum kann z.B. bei erhöhtem Blutdruck und/oder einer Schädigung des Epithels bei akuter Lungenverletzung auftreten (Althaus *et al.* 2011). Über die regulierte Na^+ - und der damit verbundenen Wasser-Resorption wird normalerweise eine Ansammlung von Flüssigkeit in der Lunge verhindert. Im Falle einer krankhaft verminderten ENaC-Aktivität kann die eingedrungene Flüssigkeit jedoch nicht adäquat resorbiert werden. Eine Beeinträchtigung der ENaC-Aktivität kann damit direkt zur Entstehung von pulmonalen Ödemen beitragen (Mairböurl 2006; Althaus *et al.* 2011).

3.2.2 Der ENaC in der Niere

Im distalen Tubulus und dem Sammelrohr der Niere trägt die Aktivität des ENaC essentiell zur Regulation des Blutvolumens - und damit einhergehend des Blutdrucks - bei (Kellenberger und Schild 2002). Eine Fehlfunktion der ENaC-Aktivität ist in diesem Zusammenhang direkt mit Krankheitsbildern wie z.B. dem *Liddle-Syndrom* oder dem autosomal rezessiven *Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 (PHA-1)* assoziiert. Beim *Liddle-Syndrom* handelt es sich um eine vererbliche Form des Bluthochdrucks (Shimkets *et al.* 1994; Snyder *et al.* 1995). Dieses erstmalig im Jahre 1963 von Liddle und Kollegen beschriebene Syndrom (Liddle *et al.* 1963) basiert auf einer *gain-of-function*-Mutation des ENaC, welche in einer gesteigerten Na^+ - und damit Wasser-Rückresorption im distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere resultiert (Shimkets *et al.* 1994; siehe Abb. 2B). Dies wiederum bedingt ein erhöhtes Blutvolumen und in Folge das Auftreten der arteriellen Hypertonie.

Demgegenüber steht der autosomal rezessive *Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 (PHA-1)*, welcher auf einer *loss-of-function*-Mutation des ENaC beruht (Chang *et al.* 1996). Wie in Abb. 2C schematisch dargestellt, resultiert die auf diese Weise verminderte renale ENaC-Aktivität durch die erhöhte Na^+ -Ausscheidung und damit dem gesteigerten Flüssigkeitsverlust in einer schweren Hypovolämie, d.h. der Verminderung des im Blutkreislauf verbleibenden Blutvolumens und bedingt damit einen Abfall des Blutdrucks (Hypotonie). Da die Resorption von Na^+ zusätzlich indirekt mit der Sekretion von K^+ und H^+ gekoppelt ist, wird gleichzeitig deren Sekretion negativ beeinflusst, was zur Ausbildung einer Hyperkaliämie (krankhaft erhöhte K^+ -Konzentration im Blut) und Azidose (Absinken des pH-Wertes im Blut) führt (Chang *et al.* 1996).

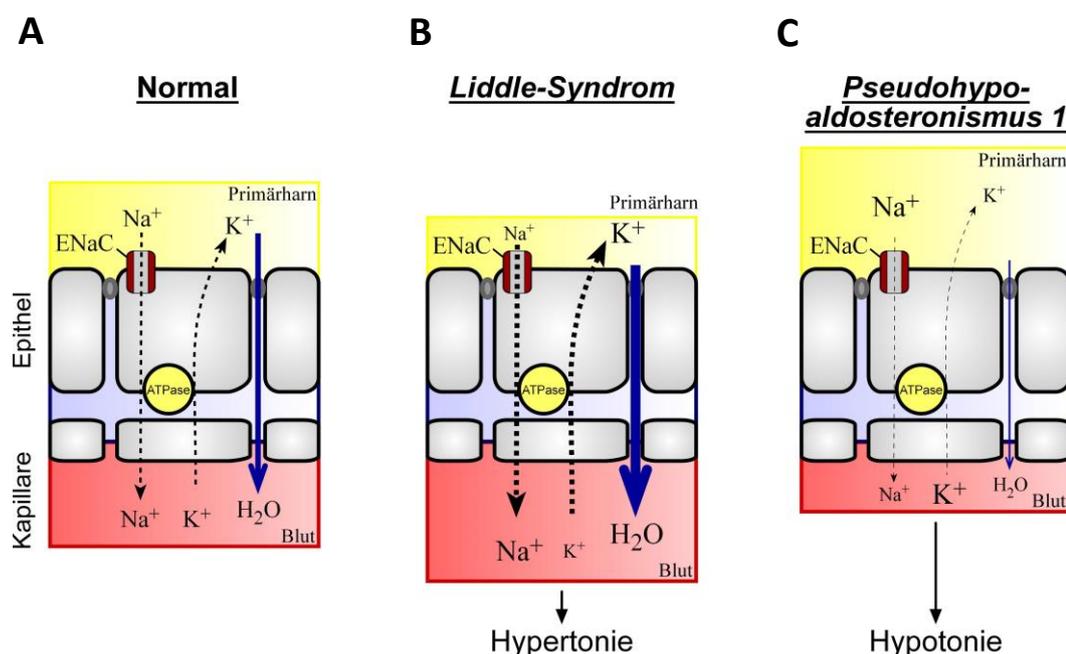


Abb. 2: Funktion des ENaC im distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere

A Unter physiologischen Bedingungen diffundieren Na^+ -Ionen durch apikal gelegene ENaCs in die Epithelzelle hinein und werden durch die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase im Austausch gegen K^+ -Ionen aus der Zelle hinaus befördert. Dem durch diesen transepithelialen Na^+ -Transport generierten osmotischen Gradienten folgt Wasser (H_2O) passiv nach und wird so aus dem Primärharn in den Blutkreislauf rückresorbiert. **B** Beim *Liddle Syndrom* bedingt eine erhöhte ENaC-Aktivität eine verstärkte Na^+ - und damit Wasserresorption. Die Folge ist ein erhöhtes Blutvolumen, was zur Entstehung von arterieller Hypertonie führt. **C** Eine verminderte ENaC-Aktivität, welche dem Entstehen des *Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 (PHA-1)* zugrunde liegt, resultiert in einer reduzierten Rückresorption von Na^+ und Wasser, was nicht nur einen erhöhten Flüssigkeits- und Elektrolytverlust zur Folge hat, sondern auch das Entstehen einer Hypovolämie und damit einhergehend eines erniedrigten Blutdrucks (Hypotonie) bedingt.

Anhand dieser pathophysiologischen Gesichtspunkte wird deutlich, dass die Aktivität des ENaC einer strengen und präzisen Kontrolle unterliegen muss, um seiner zentralen Stellung in der Elektrolyt- und Osmoregulation gerecht zu werden. Zu diesem Zweck existieren vielfältige Mechanismen, welche Einfluss auf die Aktivität des ENaC nehmen. Im Allgemeinen kann dies über zwei Wege erfolgen: 1) über die Kontrolle der Anzahl der Kanäle, welche sich auf der

Zellmembran befinden (Abundanz) und 2) über die Regulation seiner Offenwahrscheinlichkeit.

Während die Regulation seiner Abundanz vorrangig über hormonell-vermittelte Kaskaden, induziert durch Aldosteron oder Insulin (Blazer-Yost *et al.* 1998; Rossier 2002) oder β -adrenerge Agonisten (Saldías *et al.* 1998; Matthay *et al.* 2002; Fronius 2013) verläuft, wird die Aktivität des ENaC zusätzlich durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren direkt beeinflusst. Zu diesen zählen neben Proteasen (Vallet *et al.* 1997; Rossier 2004; Sheng *et al.* 2006), Kinasen (Shimkets *et al.* 1998; Diakov & Korbmacher 2004; Baines 2013), dem pH-Wert (Collier und Snyder 2009; Collier *et al.* 2012) sowie dem Substrat des ENaC, dem Na^+ -Ion selbst (Turnheim 1991) auch mechanische Reize, wie Scherkraft (Satlin *et al.* 2001; Althaus *et al.* 2007; Fronius *et al.* 2010).

3.3 Mechanische Regulation des ENaC durch Scherkraft

Scherkraft (SK) ist als eine Kraft pro Fläche definiert und wird in der Einheit dyn/cm^2 angegeben. Scherkräfte entstehen immer dann, wenn eine tangentielle Kraft (beispielsweise ein Flüssigkeitsstrom) auf eine Oberfläche (wie die Zellmembran) einwirkt. Die Größe der Scherkraft ist dabei maßgeblich von zwei Faktoren abhängig: 1) von der Viskosität der Flüssigkeit und 2) von der Geschwindigkeit, mit der sich diese Flüssigkeit fortbewegt.

Dass Scherkräfte einen adäquaten Stimulus für die Aktivierung von Ionenkanälen bilden, wurde erstmalig im Jahre 1988 von der Arbeitsgruppe um Olesen gezeigt (Olesen *et al.* 1988). Hier führte die Applikation von Scherkraft auf arterielle Endothelzellen zur Aktivierung mechanosensitiver K^+ -Kanäle. Dass auch der ENaC durch Scherkraft reguliert wird, wurde im Jahre 2001 von Satlin *et al.* demonstriert (Satlin *et al.* 2001). Sie zeigte sowohl an frisch isolierten Sammelrohren der Niere (von Kaninchen), als auch am in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten murinen ENaC, dass die Applikation eines Flüssigkeitsstromes in einer Erhöhung der ENaC-Aktivität resultierte. Erste Hinweise darauf, dass diese Scherkraft-vermittelte Aktivierung des ENaC nicht auf einer gesteigerten Abundanz der Kanäle, sondern auf einer Erhöhung seiner Offenwahrscheinlichkeit (P_o) beruht, wurden von Carratino *et al.* im Jahre 2004 publiziert. Er demonstrierte, dass ENaCs, welche durch das gezielte Einfügen einer Mutation innerhalb der Kanal-Pore bereits eine erhöhte P_o aufwiesen, nicht mehr durch Scherkräfte aktiviert werden konnten (Carattino *et al.* 2004, 2005). Im Jahr 2007 konnte mittels Einzelkanal-Ableitungen an ENaC-Orthologen des südafrikanischen Krallenfrosches (*X. laevis*), der Ratte und später auch am humanen ENaC zweifelsfrei verifiziert werden, dass Scherkräfte eine Erhöhung der P_o bewirken (Althaus *et al.* 2007; Fronius *et al.* 2010).

Sämtliche bisher genannten Studien adressierten die Mechanosensitivität des $\alpha\beta\gamma$ ENaC. Dass auch der $\delta\beta\gamma$ ENaC durch Scherkräfte aktivierbar ist, wurde erstmalig im Jahre 2011 publiziert (Abi-Antoun *et al.* 2011). Der $\delta\beta\gamma$ ENaC wurde jedoch durch SK in geringerem Ausmaß als der $\alpha\beta\gamma$ ENaC aktiviert (Abi-Antoun *et al.* 2011). Es wird angenommen, dass dieser Unterschied darin begründet ist, dass der $\delta\beta\gamma$ ENaC bereits eine (im Vergleich zum $\alpha\beta\gamma$ ENaC) erhöhte intrinsische P_O aufweist (Hamill und Martinac 2001; Abi-Antoun *et al.* 2011; Wesch *et al.* 2011; Shi *et al.* 2013).

3.3.1 Physiologische Bedeutung der ENaC-Mechanosensitivität

Unter physiologischen Bedingungen ist der ENaC durch seine strategische Position in der apikalen Membran zahlreicher Epithelien, aber auch in nicht-epithelialen Geweben (z.B. in Endothelien und neuronalen Zellen, wie etwa Nervenendigungen) Scherkräften unmittelbar ausgesetzt. Diese ergeben sich beispielsweise durch den Fluss des Primärharns in den Nierentubuli, den Blutstrom im vaskulären System oder den durch die Ventilation hervorgerufenen Bewegungen der Lunge. Auch direkte mechanische Berührungen der Zelloberfläche, wie sie etwa an den Nervenendigungen von Tastsinneszellen entstehen, können einen direkten Einfluss auf die Aktivität dieses Na^+ -Kanals ausüben.

Die Fähigkeit des ENaC, diese mechanischen Reize zu detektieren macht ihn damit zu einem geeigneten Kandidaten, um physikalische Änderungen in der Umgebung wahrzunehmen, in zelluläre Signale (z.B. über eine Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration) umzuwandeln und damit unmittelbar auf die veränderten Bedingungen zu reagieren. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass das Ausmaß der Na^+ -Resorption im Sammelrohr der Niere direkt mit der Fließgeschwindigkeit und damit der Höhe der auf das Epithel einwirkenden Scherkräfte korreliert (Morimoto *et al.* 2006). Zudem mehrten sich in den vergangenen Jahren die Hinweise darauf, dass der ENaC in Endothelien als Scherkraft-Sensor an der Regulation der nanomechanischen Eigenschaften von Endothelzellen beteiligt sein könnte und damit auch in diesen Zellen die Blutdruck-Regulation beeinflusst (Drummond *et al.* 2004; Kusche-Vihrog *et al.* 2010; Warnock 2013; Kusche-Vihrog *et al.* 2014b).

Auch im Lungenepithel könnte die Mechanosensitivität des ENaC eine physiologische Funktion erfüllen. Durch die Atembewegungen wird die Oberfläche der Epithelzellen Scherkräften ausgesetzt (Tarran *et al.* 2005; Fronius und Clauss 2008). Diese entstehen, da der *airway surface layer* (ASL), welcher das Epithel bedeckt, während der Atembewegungen relativ statisch verbleibt, während sich das Gewebe im Zuge der In-, bzw. Exhalation phasisch bewegt (Fronius und Clauss 2008). Die Mechanosensitivität des ENaC könnte auf diese Weise unmittelbar zur Regulation der Höhe des ASL beitragen und würde zudem eine mögliche

Erklärung dafür liefern, warum beim Krankheitsbild der *Cystischen Fibrose* eine erhöhte ENaC-Aktivität beobachtet wird (Mall *et al.* 2004). Die auf das Epithel und damit die ENaCs einwirkenden Scherkräfte sind umso größer, je viskoser der ASL ist, der das Epithel bedeckt (Fronius und Clauss 2008). Im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der *cystischen Fibrose* (welche durch einen viskosen/zähflüssigen ASL gekennzeichnet ist) könnte die erhöhte ENaC-Aktivität, die bei dieser Krankheit beobachtet wird, durchaus durch die (im Vergleich zu gesunden Menschen) erhöhten auf den Kanal einwirkenden Scherkräfte bedingt sein (Fronius und Clauss 2008).

Last but not least lässt das Vorhandensein von ENaC-Untereinheiten in peripheren Nervenendigungen, wie z.B. in der Pfote (Drummond *et al.* 2000) oder in mechanosensitiven Nervenendigungen des Gesichtsnervensystems der Ratte (Fricke *et al.* 2000) vermuten, dass dem ENaC in diesen Geweben auf Grund seiner Mechanosensitivität eine Rolle bei der Tast-Sensorik zufallen könnte. Gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass mit dem ENaC verwandte Proteine, die sogenannten MEC-Proteine, am Aufbau mechanosensitiver Kanäle im Nematoden *C. elegans* beteiligt sind (O'Hagan *et al.* 2004) und deren Mutation zu taktilen Störungen führte (Chalfie und Au 1989).

3.3.2 Mechanismus der Scherkraft-Wahrnehmung

Aus den beschriebenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen und den dabei auftretenden Scherkräften erschließt sich die mögliche Relevanz der ENaC - Mechanosensitivität für Erkrankungen wie Bluthochdruck und *Cystische Fibrose*, aber auch für Störungen von taktilen Wahrnehmungen (*Propriozeption*). Trotz zahlreicher Studien, die sich mit der Identifikation des der Scherkraft-Wahrnehmung zugrunde liegenden molekularen Mechanismus beschäftigten, ist dieser bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Bislang wurden zwei Modelle vorgeschlagen, welche die Wahrnehmung von mechanischen Reizen durch Ionenkanäle im Allgemeinen erklären:

1. Das *Bilayer* Modell besagt, dass das *gating* mechanosensitiver Ionenkanäle, welche innerhalb der Zellmembran verankert sind, über mechanisch hervorgerufene Deformationen der Zellmembran oder Veränderungen in der Membranspannung beeinflusst wird (Martinac 2004; Eastwood und Goodman 2012; Shi *et al.* 2013).
2. das *tethered* Modell hingegen geht von einer Verknüpfung des Ionenkanals mit intrazellulären Komponenten des Zytoskeletts und/oder Bestandteilen der Extrazellulären Matrix aus. Es besagt, dass die Übertragung der mechanischen Stimuli

über diese mit dem Kanal verbundenen Komponenten erfolgt (Hamill und Martinac 2001; Martinac 2004; Shi et al. 2013).

In diesem Zusammenhang konnte das *Bilayer* Modell und damit die Hypothese, dass die Wahrnehmung der Scherkraft über eine Verankerung des ENaC in der Zellmembran erfolgt, bereits ausgeschlossen werden. Eine Studie aus dem Jahr 2007 zeigt, dass weder eine gezielte Beeinflussung der Membranfluidität durch Temperaturänderungen oder die Manipulation des Cholesterolgehaltes der Zellmembran zu einer Beeinflussung der durch Scherkraft induzierten ENaC-Aktivierung führte (Carattino *et al.* 2007).

Auch eine Beteiligung des Zytoskeletts an der Scherkraftwahrnehmung des ENaC wurde bereits eingehend untersucht. Die beiden Hauptkomponenten des Zytoskeletts stellen Aktin-Filamente und Mikrotubuli dar. Beide Komponenten nehmen eine zentrale Rolle bei der Regulation des intrazellulären *trafficking* von Ionenkanälen, sowie bei ihrer Insertion in die Zellmembran ein (Mazzochi *et al.* 2006). Auch ist bereits bekannt, dass die α -Untereinheit des ENaC über ihren C-Terminus mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft ist (Mazzochi *et al.* 2006). Jedoch zeigte weder ein pharmakologischer Abbau der Aktin-Filamente, noch des Mikrotubuli-Systems eine Auswirkung auf die Scherkraft-induzierte Aktivierung des ENaC (Morimoto *et al.* 2006; Karpushev *et al.* 2010). Auch bei einer Deletion der C-terminalen Bereiche aller drei ENaC-Untereinheiten (und damit der Entfernung von potenziellen Bindestellen zum Zytoskelett) wurde der ENaC weiterhin durch Scherkräfte aktiviert (Carattino *et al.* 2004). Basierend auf diesen Studien wurde daher auch eine Beteiligung des Zytoskeletts in der Scherkraft-Wahrnehmung des ENaC ausgeschlossen (Shi *et al.* 2013).

Seither rückten die großen Extrazellulären Domänen der ENaC-Untereinheiten als mögliche Mechanosensoren zunehmend in den Fokus. Sie sind durch ihre exponierte, dem Zell-Äußeren zugewandte Position zum einen in der Lage, die Bewegung von Flüssigkeiten (und damit Scherkräfte) wahrzunehmen und stehen zum anderen mit der *gating*-Maschinerie der Pore in Verbindung (Fronius und Clauss 2008). Aus diesem Grund wird angenommen, dass sie als „Antennen“ fungieren könnten, welche durch auftretende Scherkräfte ausgelenkt werden (vgl. Abb. 3) und somit eine das *gating* beeinflussende Konformationsänderung des Kanals induzieren. Die Folge könnte eine erhöhte Na^+ -Transportrate und damit eine gesteigerte ENaC-Aktivität sein (Fronius und Clauss 2008; Shi *et al.* 2013).

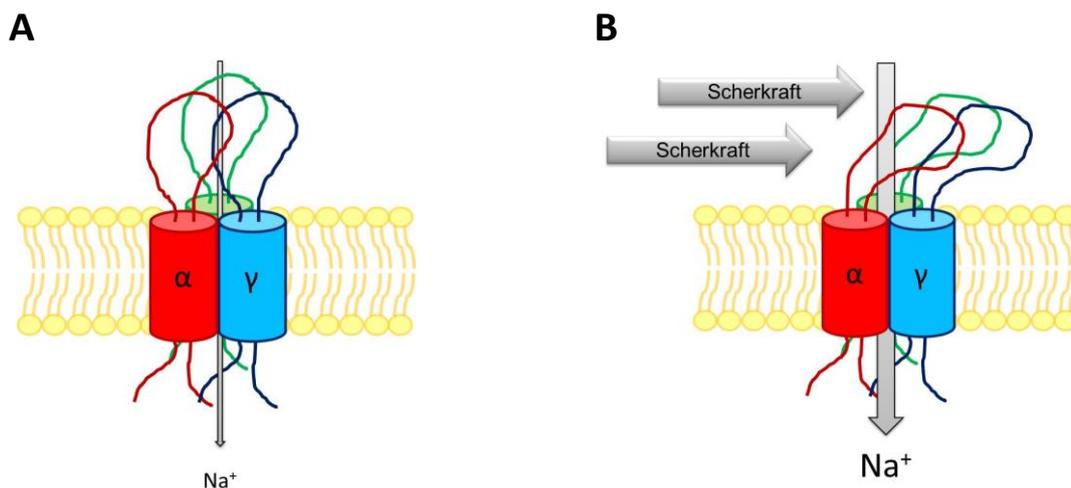


Abb. 3: Hypothetische Rolle der Extrazellulären Domänen als Scherkraft-Sensoren

A Die in den extrazellulär-Raum ragenden Domänen der ENaC-Untereinheiten könnten als „Antennen“ fungieren, welche durch auftretende Scherkräfte (durch Pfeile symbolisiert) ausgelenkt werden (**B**). Dies wiederum könnte eine das *gating* des Kanals beeinflussende Konformationsänderung des Kanals bewirken, wodurch vermehrt Na^+ -Ionen in die Zelle einströmen.

Unklar ist bislang, ob die Extrazellulären Domänen - sofern sie denn für die Scherkraft-Detektion verantwortlich sind - direkt ausgelenkt werden, oder ob in Übereinstimmung mit dem *tethered*-Modell eine Verankerung in der die Zelle bedeckenden Extrazellulären Matrix notwendig ist, um Scherkräfte detektieren zu können. Die Extrazelluläre Matrix umhüllt sowohl Epithel- als auch Endothelzellen und besteht aus Proteinen, Glykosaminoglykanen (wie z.B. Hyaluronsäure) und Proteoglykanen in veränderlichen Mengenanteilen. Sie dient u.a. der Formgebung von Geweben oder der Wasserspeicherung - ist aber auch an Mechanotransduktionsprozessen beteiligt (Alberts *et al.* 2002; Frantz *et al.* 2010; Kim *et al.* 2011). Bei einem Mechanorezeptor-Komplex in Neuronen des Nematoden *C. elegans*, welcher aus ebenfalls zur DEG/ENaC-Familie zugehörigen MEC-Proteinen aufgebaut ist, wurde die Verbindung der MEC-Proteine zu Komponenten der Extrazellulären Matrix - sowie die Notwendigkeit dieser Verbindung für die Mechanosensitivität - bereits nachgewiesen (Bounoutas und Chalfie 2007). Auf Grund der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen den MEC-Proteinen und dem ENaC wäre die Möglichkeit einer Verbindung zwischen ENaC und Extrazellulärer Matrix daher durchaus vorstellbar. In diesem Falle würde eine durch Scherkräfte verursachte Verformung der Extrazellulären Matrix über die Verankerung auf den Kanal übertragen und so zur Auslenkung der Extrazellulären Domänen und damit der mechanischen Aktivierung des Kanals führen (Fronius und Clauss 2008; siehe Abb. 4).

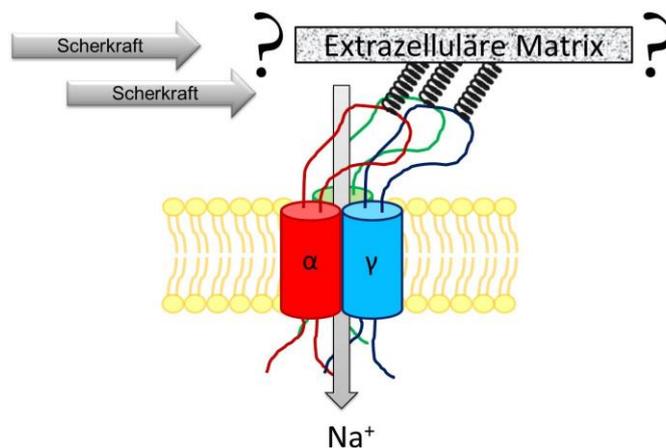


Abb. 4: Potenzielle Rolle der Extrazellulären Matrix in der Scherkraft-Wahrnehmung des ENaC

Denkbar wäre, dass der ENaC auftretende Scherkräfte nicht direkt wahrnehmen kann, sondern dass hierfür eine Verankerung der Extrazellulären Domänen in der die Zelle bedeckenden Extrazellulären Matrix notwendig ist. Die Verformung der Extrazellulären Matrix durch Scherkräfte (Pfeile) könnte über die Verankerung auf die Extrazellulären Domänen übertragen werden und so deren Auslenkung bedingen. Die Folge wäre eine erhöhter Na^+ -Einstrom und damit die Aktivitätserhöhung des ENaC.

Durch das Einfügen zielgerichteter Mutationen wurden bereits zahlreiche Bereiche innerhalb der Extrazellulären Domäne, aber auch in der Poren-Region des ENaC identifiziert, welche an dessen Scherkraft-Antwort beteiligt sind (Carattino *et al.* 2005; Abi-Antoun *et al.* 2011; Shi *et al.* 2012a; Shi *et al.* 2012b; Shi *et al.* 2013). Dies schloss man aus der Tatsache, dass die generierten ENaC-Mutanten eine im Vergleich mit dem Wildtyp veränderte Reaktion auf Scherkraft aufwiesen. So war bei diesen Mutanten entweder das Ausmaß der durch Scherkraft induzierten Aktivierung (im Vergleich mit dem Wildtyp) beeinträchtigt, und/oder die Zeit zwischen der Applikation des Reizes und der darauffolgenden Aktivierung des Kanals. Auch eine veränderte Zeitkonstante, welche ein Maß für die Geschwindigkeit der durch Scherkraft hervorgerufenen Änderung des Na^+ -Stromes ist, galt als Indikator für die Beteiligung der mutierten Domänen in der Scherkraft-Wahrnehmung des Kanals (Carattino *et al.* 2005; Abi-Antoun *et al.* 2011; Shi *et al.* 2012a; Shi *et al.* 2012b; Shi *et al.* 2013). Anhand dieser Studien konnte jedoch bisher nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden, ob die identifizierten Domänen direkt mit der Wahrnehmung der Scherkraft in Verbindung stehen, oder lediglich in die Übertragung des Reizes auf die *gating*-Maschinerie der Pore involviert sind (Shi *et al.* 2013).

3.4 Ziele der Dissertation

Die Aufklärung des detaillierten molekularen Mechanismus, welcher der Scherkraft-Wahrnehmung des ENaC zugrunde liegt, würde wichtige Einblicke in die Regulation dieses essentiellen Ionenkanals liefern und war daher das Ziel der vorliegenden Dissertation. Im Fokus der Experimente standen hierbei die Extrazellulären Domänen der ENaC-Untereinheiten und deren mögliche Interaktion mit der Extrazellulären Matrix. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde der humane ENaC heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert und seine Reaktion auf Scherkraft mittels elektrophysiologischer Methoden eingehend charakterisiert. Sämtliche Experimente der vorliegenden Dissertation wurden dabei simultan sowohl für den $\alpha\beta\gamma$ - als auch für beide Isoformen des $\delta\beta\gamma$ ENaC ($\delta 1$ und $\delta 2$) durchgeführt, da mögliche auftretende Unterschiede im Verhalten der beiden Kanäle in Reaktion auf Scherkraft Einblicke in die differenziellen Funktions- und Regulationsmechanismen der beiden Kanaltypen bieten sollten.

Um eine Beteiligung der Extrazellulären Matrix an der Scherkraft-Wahrnehmung des Kanals zu untersuchen, wurde der ENaC heterolog in *X. laevis* Oozyten exprimiert, deren Extrazelluläre Matrix zuvor mechanisch und enzymatisch entfernt worden war. Hierfür wurden Enzyme gewählt, welche speziell gegen Strukturbestandteile der Extrazellulären Matrix gerichtet waren (Hyaluronidase wurde zum Abbau von Hyaluronsäure, Elastase zur Degradierung von Elastin eingesetzt). Der durch Scherkraft hervorgerufene Effekt wurde dann mit demjenigen von Kontroll-Oozyten (mit intakter Extrazellulärer Matrix) verglichen. Des Weiteren sollten über das Einfügen zielgerichteter Mutationen innerhalb der Extrazellulären Domänen potenzielle Anknüpfungstellen zwischen dem Kanal und der Extrazellulären Matrix entfernt werden, um auf diese Weise mögliche Verknüpfungspunkte zu lokalisieren. Die Scherkraft-Reaktion dieser Mutanten wurde anschließend mit derjenigen des Wildtyp-ENaC verglichen. Beide Ansätze (sowohl das Degradieren der Extrazellulären Matrix, als auch das Entfernen der potenziellen Bindestellen) basierten auf der Annahme, dass die durch Scherkraft vermittelte Erhöhung der ENaC-Aktivität geringer ausfallen müsste, sollte die Extrazelluläre Matrix - bzw. die Verbindung zu ihr - notwendig sein, um diesen mechanischen Reiz zu detektieren und auf den Kanal zu übertragen. Auf diese Weise sollte eine Beteiligung der Extrazellulären Matrix an der Scherkraft-vermittelten Aktivierung des ENaC überprüft, bzw. nachgewiesen werden.

II Material und Methoden

1 *Xenopus laevis*

1.1 Systematische Einordnung

Sämtliche Untersuchungen der vorliegenden Dissertation wurden an Eizellen (Oozyten) adulter Weibchen des Südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) durchgeführt. Die genaue systematische Einordnung dieses Tieres lautet wie folgt (*NCBI Taxonomy Database*):

Stamm:	Chordata
Unterstamm:	Vertebrata
Klasse:	Amphibia
Ordnung:	Anura
Superfamilie:	Pipoidea
Familie:	Pipidae
Unterfamilie:	Xenopodinae
Gattung:	<i>Xenopus</i>
Art:	<i>Xenopus laevis</i>

1.2 Vorkommen und Morphologie

Das natürliche Vorkommen des Südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) beschränkt sich auf den südlichen Teil Afrikas, wo er sich bevorzugt in warmen, meist stehenden und schlammigen Gewässern aufhält (Hilken 1997). Die Anpassung an seine aquatische Lebensweise äußert sich sowohl in seiner Körperform, die durch die dorsoventrale Abflachung, die seitlich abstehenden Extremitäten und die nach oben gerichteten Augen ausgezeichnet ist, als auch durch sein ausgeprägtes Seitenliniensystem (Hilken 1997). Neben markanten Schwimmhäuten besitzt *Xenopus laevis* an den hinteren Extremitäten schwarze Krallen, welche namensgebend für die Gattung der Krallenfrösche sind. Die Oberseite des Tieres weist eine dunkle, grau-grüne Färbung auf, wohingegen die Unterseite einen weißlich-gelben Farbton besitzt. Weibliche Tiere werden in der Regel 10 bis 12 cm lang, männliche bleiben hingegen mit 7 bis 9 cm deutlich kleiner.

Der Südafrikanische Krallenfrosch weist eine euryöke Lebensweise auf (Hilken 1997), d.h. er ist nicht an bestimmte Umweltbedingungen gebunden, sondern sehr anpassungsfähig. Dieses hohe Maß an Anpassungsfähigkeit und die Tatsache, dass die Tiere kein territoriales Verhalten zeigen (Haubrich 1961), machen ihn zu einem beliebten Labortier, da die Haltung in Gefangenschaft relativ anspruchslos ist.

1.3 Tierhaltung

Die Tiere wurden von der Firma *Xenopus Express* France (Vernassal, Haute-Loire, Frankreich) bezogen. Die Haltung und Tötung der Tiere erfolgte konform mit dem Tierschutzgesetz und war genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen (Meldenummer *Xenopus laevis* 478_M). Der Gesundheitsstatus der Tiere wurde entsprechend des Tierschutzgesetzes täglich kontrolliert.

Die Frösche wurden in Gruppen von 11 Individuen in schwarzen Kunststoffbecken (L x B x H in cm: 100 x 50 x 50) mit einem Fassungsvermögen von 250 l bei einem Wasserpegel von ~ 45 cm gehalten. Die Becken verfügten über einen kontinuierlichen Wasserdurchlauf sowie ein abdeckendes Gitter, welches die Tiere am Entweichen hinderte. Die Wassertemperatur wurde durch den Einsatz von Heizstäben bei konstant 20 °C gehalten und die Sauerstoffversorgung durch die Zuleitung von Druckluft über Sprudelsteine gewährleistet. Als Unterschlupf standen den Tieren halbierte Tontöpfe am Grund des Beckens zur Verfügung. Einmal wöchentlich wurden die Tiere mit handelsüblichem Fischfutter gefüttert und Nahrungsreste und Exkremate zwei Tage darauf mittels Wasserwechsel entfernt. Die Wasserqualität (pH-Wert, Nitrat und Nitrit) wurde fortlaufend einmal monatlich durch entsprechend geschulte Mitarbeiter des Instituts geprüft und protokolliert.

2 Die Oozyten des *Xenopus laevis*

Die Oozyten des *Xenopus laevis* sind in der Elektrophysiologie schon seit der erstmaligen Expression eines Fremdproteins 1971 (Gurdon *et al.* 1971) als heterologes Expressionssystem von exogenen Membranproteinen beliebt. Die Vorteile dieses Expressionssystems liegen nicht nur in der vergleichsweise einfachen Haltung der Tiere, sondern auch in der Tatsache, dass adulte Weibchen ganzjährig Oozyten in verschiedenen Reifestadien besitzen. Diese liegen in Ovariallappen, umgeben von Bindegewebe und Follikelzellen, vor. Sie können den Tieren entnommen werden, ohne dass es hierfür getötet werden muss. Ein weiterer essentieller Vorteil besteht in der relativen Größe der Oozyten (bis zu 1,3 mm; Dumont 1972), welche ein schnelleres und einfacheres Einbringen fremder RNA als beispielsweise in Säugerzellen erlaubt (Soreq 1985). Die Oozyten sind zudem einfach zu kultivieren, da sie weder teure Nährmedien, noch eine sterile Umgebung benötigen, wie dies beispielsweise bei einer Zellkultur der Fall ist (Dumont 1972).

2.1 Morphologie

Die *Xenopus* Oozyten, welche für die experimentellen Untersuchungen eingesetzt wurden, sind in der Prophase der ersten meiotischen Teilung arretiert (Dascal 1987). Während diesem Entwicklungsabschnitt durchlaufen die Zellen sechs unterschiedliche Reifephasen (Dumont 1972). In morphologischer Hinsicht unterscheiden sich die Oozyten in diesen Stadien im Wesentlichen bezüglich ihrer Größe und Pigmentierung.

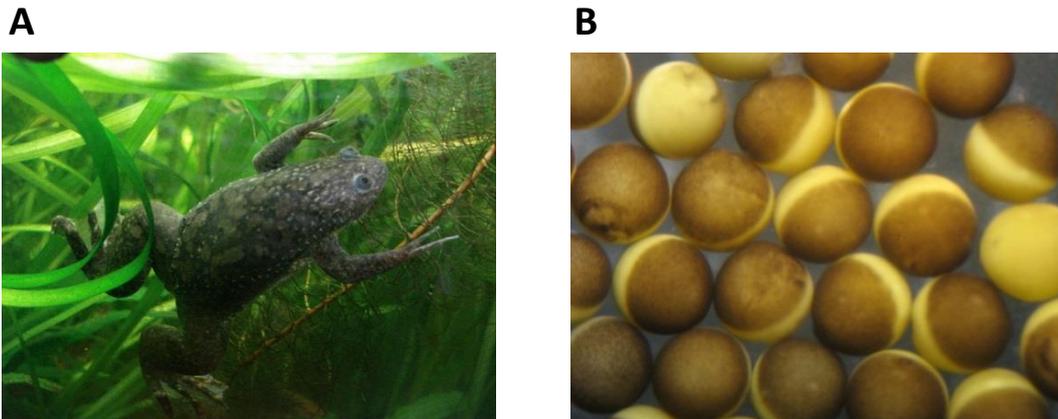


Abb. 5: *Xenopus laevis* und seine Oozyten

A Der Südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* (entnommen aus Olivier 2012), sowie **B** vereinzelte Oozyten im Stadium V. Diese weisen eine deutliche äquatoriale Unterteilung in eine animale (braune) und eine vegetative (gelbliche) Hemisphäre auf.

In den für die experimentellen Untersuchungen eingesetzten Stadien V und VI weisen die Zellen einen Durchmesser von 1,0 bis 1,3 mm auf (Dumont 1972). Auch sind die Eizellen in diesen Stadien deutlich in eine animale und eine vegetative Hemisphäre unterteilt. Die vegetative Hemisphäre ist auf Grund kristallin gepackter Dotterproteine gelblich-beige gefärbt, während der animale Pol durch eine vermehrte Einlagerung des Pigments Melanin eine dunkelbraune Färbung aufweist (Dascal 1987; vgl. Abb. 5B). Im Stadium VI sind beide Hemisphären zusätzlich durch einen hellen, unpigmentierten Äquatorialring voneinander separiert.

Die Oozyten richten sich im Wasser stets mit dem dunkel gefärbten, animalen Pol nach oben aus. Dies dient nicht nur der Protektion vor einwirkender Sonnen-, bzw. UV-Strahlung (Duellman 1994), sondern auch dem Schutz vor Fressfeinden, welche die dunkel gefärbten Zellen am Grund des Gewässers schlechter wahrnehmen können (Hilken 1997). Die beiden Hemisphären unterscheiden sich zudem u.a. bezüglich der Beweglichkeit ihrer Membranlipide, welche in der vegetativen Hemisphäre bis zu fünfmal höher ist (Dascal 1987). Auch ist der Anteil an mRNA und Dotter in diesem Pol ungleich höher, wohingegen der Zellkern stets in der animalen Hemisphäre lokalisiert ist (Dascal 1987).

2.2 *Xenopus* Oozyten als heterologes Expressionssystem

Durch eine hohe Anzahl an Ribosomen weisen *Xenopus* Oozyten eine hohe translationale Kapazität auf, so dass die Rate der Proteinbiosynthese höher ist als in zellfreien Systemen (Mertz und Gurdon 1977). Im Gegensatz zu prokaryotischen Expressionssystemen oder *in vitro* Translationssystemen werden die genetischen Informationen in den omnipotenten Oozyten korrekt prozessiert. Dies bedeutet, dass sowohl die Abspaltung von Signalsequenzen, als auch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung, proteolytische Spaltung (*cleavage*) und Glykosylierung korrekt erfolgen (Gurdon *et al.* 1971; Sumikawa *et al.* 1981). Die entstandenen Proteinprodukte lokalisieren im Anschluss in der Oozyten-Membran, so dass integrale Membranproteine dort funktionstüchtig agieren (Hilken 1997). Zur heterologen Expression in Oozyten wird entweder cRNA ins Zytoplasma injiziert, oder DNA direkt in den Zellkern eingebracht (Mertz und Gurdon 1977). Dabei wird die Translation der fremden cRNA nicht durch endogene RNA behindert, da diese durch Proteinassoziationen bis zu 80% „maskiert“ vorliegt („masked“ RNA; Spirin 1994; Bouvet und Wolffe 1994). Die endogene RNA wird zudem kompetitiv gehemmt, da die Menge der injizierten RNA bei weitem höher ist (Taylor *et al.* 1985).

Xenopus Oozyten sind mit allen Faktoren und Substraten ausgestattet, die für Wachstum und Proteinbiosynthese notwendig sind (Wagner *et al.* 2000). Hierdurch sind sie nicht auf die Aufnahme von Nährstoffen angewiesen und somit von ihrem umgebenden Milieu weitgehend unabhängig. Dies wiederum hat zur Folge, dass *Xenopus* Oozyten nur wenige endogene Transportsysteme in ihrer Membran exprimieren (Wagner *et al.* 2000), was einen entscheidenden Vorteil in der elektrophysiologischen Forschung darstellt.

Neben den vielfältigen, essentiellen Vorteilen dieses Expressionssystems sind jedoch auch einige Nachteile bekannt. Diese liegen zum einen in der großen Variabilität der Oozyten-Qualität zwischen verschiedenen Donoren (Rossier 1998). Diese Variabilität kann durch Unterschiede in der Wasserqualität, saisonaler Varianz (Soreq 1985) aber auch anderen, bisher unklaren Ursachen geschuldet sein (Rossier 1998). Zudem können in den Oozyten Faktoren fehlen, die für die korrekte Regulation der Membranproteine essentiell sind, wie beispielsweise essentielle Rezeptoren oder Komponenten in Signaltransduktionskaskaden (Rossier 1998; Wagner *et al.* 2000). Auch muss bei der Arbeit mit *Xenopus* Oozyten in Betracht gezogen werden, dass es sich bei dem Südafrikanischen Krallenfrosch um ein poikilothermes Tier handelt (Wagner *et al.* 2000). Daher sollten die Oozyten bei niedrigen Temperaturen (ca. 17 °C) gelagert und alle Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Dies wiederum hat zur Folge, dass Temperatur-sensitive Vorgänge, wie z.B. das Protein-*trafficking* oder die Regulation temperatursensitiver Ionenkanäle beeinträchtigt sein könnten (Wagner *et al.* 2000).

2.3 Entnahme und Präparation der Oozyten

Für die Entnahme von Oozyten ist es prinzipiell nicht notwendig, das Versuchstier zu töten, da die Frösche unter Narkose einer Laparotomie unterzogen werden könnten. Da jedoch für andere Studien im Labor zusätzlich die Lungen der Frösche benötigt wurden, wurden die Versuchstiere zunächst für ca. 10 - 15 min bei 4 °C, dann für ca. 45 min auf Eis hypothermal ruhig gestellt, anschließend durch Dekapitation getötet und das Rückenmark sondiert. Die Tötung der Versuchstiere wurde ausschließlich durch entsprechend geschulte Mitarbeiter des Instituts durchgeführt.

Nach dem Entfernen der Bauchhaut und dem Durchtrennen der Muskelschicht konnten die Oozyten, die in verschiedenen Reifungsstadien in den Ovariallappen vorliegen, entnommen und in KulORi (Kultur-Oozyten-Ringer, siehe Tab. 1) aufbewahrt werden. Um die durch Bindegewebe miteinander verbundenen Oozyten voneinander zu trennen, wurde ein Teil des Ovars vorsichtig mit zwei feinen Pinzetten in einer Petrischale zerkleinert und 90 min in einer Lösung aus KulORi und Kollagenase (1,5 mg/ml, NB4, SERVA) auf einem Horizontal-Schüttler (*IKA-VIBRAX-VXR*, Janke & Kunkel) inkubiert. Kollagenase bewirkt den enzymatischen Verdau des kollagenhaltigen Bindegewebes, wodurch sich die Zellen voneinander lösen. Anschließend wurden die Zellen in KulORi drei- bis fünfmal gewaschen, um die Kollagenase vollständig zu entfernen. Eine anschließende 10minütige Inkubation in Ca^{2+} -freiem ORi (Ca^{2+} -freier Oozyten-Ringer, siehe Tab. 1) bewirkte ein Auflösen der Zell-Zell-Verbindungen zwischen den Oozyten und anhaftenden Follikelzellen, z.B. von *tight-junctions* und Cadherinen, da diese zu ihrer Erhaltung Ca^{2+} benötigen. So wurde ein Ablösen der eventuell noch anhaftenden Follikelzellen bewirkt. Nach erneutem Waschen mit KulORi wurden Zellen der Stadien V und VI (Dumont 1972) unter dem Binokular aussortiert, wobei auf eine deutliche Pigmentierung, eine gut sichtbare Abgrenzung des vegetativen vom animalen Pol und ein kugeliges Erscheinungsbild der Oozyten geachtet wurde.

Native Oozyten wurden in KulORi gelagert. In diesem befanden sich Natrium-Pyruvat (als Nährstoff) und die Antibiotika Streptomycin und Penicillin, um eventuellen Infektionen, bzw. der Besiedelung mit Mikroorganismen vorzubeugen. Mit ENaC-cRNA injizierte Oozyten wurden ausschließlich in NMDG-KulORi (N-Methyl-D-Glucamin Kultur-Oozyten-Ringer, siehe Tab. 1) gelagert. Im NMDG-KulORi wurde das Na^+ nahezu vollständig durch das membranimpermeable NMDG substituiert. Dies diente dem Zweck, einen übermäßigen Einstrom von Na^+ -Ionen durch den exprimierten Na^+ -Kanal zu unterbinden und gleichzeitig dafür zu sorgen, dass es trotz des fehlenden Na^+ zu keinen osmotischen Differenzen kam.

Alle Zellen wurden einzeln in *multiwell*-Platten gelagert, da absterbende Oozyten apoptotische Signale aussenden können, die wiederum ein Absterben der übrigen Zellen induzieren

könnten. Bei täglichem Lösungswechsel konnten die Oozyten so bis zu einer Woche bei 17° C im Brutschrank (*GTR0214*, MEMMERT) gelagert werden.

2.3.1 Lösungen zur Präparation der Oozyten

Sämtliche zur Präparation und Kultivierung der Oozyten verwendeten Lösungen wurden in entmineralisiertem (VE-) Wasser angesetzt. Die detaillierte Zusammensetzung der Lösungen, die zur Vereinzelung und Kultivierung der Oozyten verwendet wurden, ist in Tab. 1 angegeben. Der pH-Wert der Lösungen wurde durch Titration mit 32 %iger Salzsäure (HCl), 1 M NaOH (bei KulORi und Ca²⁺-freiem ORi) bzw. 3 M TRIZMA (für NMDG-KulORi) auf 7,4 eingestellt.

Tab. 1: Zusammensetzung der Lösungen zur Vereinzelung und Kultivierung der Oozyten

	KulORi [mM]	Ca²⁺-freier ORi [mM]	NMDG - KulORi [mM]
NaCl	90	90	10
KCl	1	1	1
CaCl ₂	2	-	2
HEPES	5	5	5
MgCl ₂	-	1	-
NMDG	-	-	80
Na ⁺ -Pyruvat	2,5	-	2,5
EGTA	-	1	-
Penicillin	0,02*	-	0,02*
Streptomycin	0,025*	-	0,025*

Der pH-Wert der Lösungen wurde mit 32%iger Salzsäure (HCl), 1 M NaOH (bei KulORi und Ca²⁺-freiem ORi) bzw. 3 M TRIZMA (für NMDG-KulORi) auf 7,4 eingestellt.

KulORi: Kultur-Oozyten-Ringer;

Ca²⁺-freier ORi: Ca²⁺-freier Oozyten-Ringer;

HEPES: N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure);

NMDG: N-Methyl-D-Glucamin;

EGTA: Ethylenglycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

* Mengenangaben sind in g/l.

2.4 Degradierung der Extrazellulären Matrix von *Xenopus* Oozyten

Die Extrazelluläre Matrix der *Xenopus* Oozyten besteht aus zwei Komponenten: 1) der Vitellinhülle, und 2) Komponenten innerhalb des perivitellinen Spaltes (Larabell 1988; Hedrick und Nishihara 1991; vgl. Abb. 6).

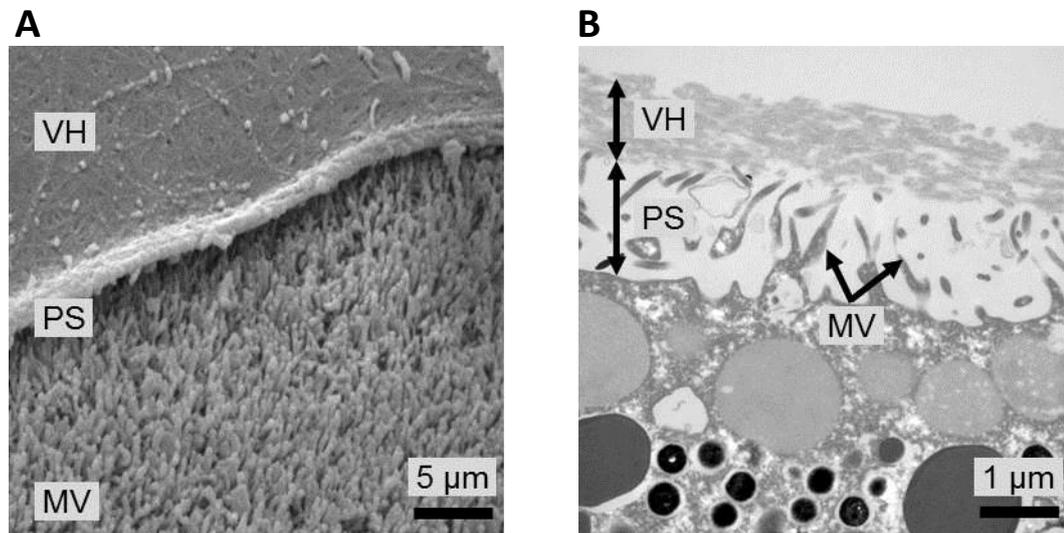


Abb. 6: Die Extrazelluläre Matrix von *Xenopus* Oozyten

A Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer zur Hälfte devitellinisierten Oozyte. Die Membran der Oozyte ist charakterisiert durch zahlreiche Mikrovilli (MV), welche in den perivitellinen Spalt (PS) hineinragen. Auf die Membran aufgelagert befindet sich die Vitellinhülle (VH).
B Querschnitt durch die Extrazelluläre Matrix einer Oozyte.

Diese Komponenten wurden für einige Messungen sowohl mechanisch, als auch enzymatisch entfernt. Die erfolgreiche Degradierung wurde anschließend Rasterelektronenmikroskopisch (REM) verifiziert. Hierfür wurden die Oozyten (deren Extrazelluläre Matrix degradiert war) ebenso wie Kontroll-Oozyten (mit intakter Extrazellulärer Matrix) direkt im Anschluss an die elektrophysiologischen Messungen in einem Fixiermedium fixiert. Das Fixiermedium bestand aus 1,5% Glutardialdehyd (25 %ig; Plano GmbH) plus 1,5% Paraformaldehyd (Merck) in einem 0,15 molaren Hespuffer (Calbiochem). Die anschließende Aufbereitung der Zellen, sowie die REM- und TEM-Aufnahmen wurden dankenswerterweise von Hr. Gerd Magdowski aus dem *Institut für Anatomie und Zellbiologie* der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

2.4.1 Mechanische Devitellinisierung

Die Vitellinhülle der *Xenopus* Oozyten ist eine ca. 1 µm dicke glykoproteinreiche Matrix, welche die Zelle umgibt und ihr - ähnlich einem Exoskelett - Formstabilität verleiht. Um sie zu entfernen, wurden zuvor vereinzelte Oozyten (vgl. Abschnitt 2.3) für ca. 5 - 10 min in einer Petrischale (NUNC) mit 15 ml KulORi inkubiert, welchem 1,5 g Mannitol (Sigma) zugesetzt

wurde. Die auf diese Weise erhöhte Osmolarität der Lösung induzierte ein Schrumpfen der Oozyte, während die umgebende Vitellinhülle selbst ihre Form behielt. Auf diese Weise konnte die Vitellinhülle mittels zweier feiner Pinzetten erfasst und entfernt werden (Abb. 7).

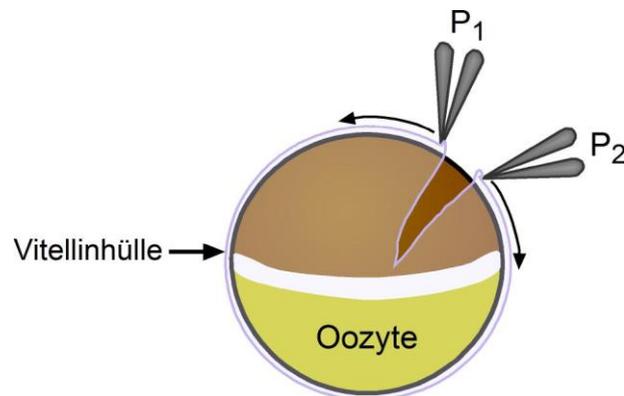


Abb. 7: Mechanische Devitellinisierung einer *Xenopus* Oozyte

Die die Zelle umhüllende Vitellinhülle wurde mittels zweier feiner Pinzetten (P₁ und P₂) mechanisch entfernt.

Die devitellinisierten Oozyten wurden anschließend zum Entfernen des Mannitols vorsichtig in eine mit KulORi befüllte, gläserne Petrischale überführt. Erst anschließend wurden die Oozyten entweder in die Messkammer eingebracht, oder zur weiteren enzymatischen Behandlung der Extrazellulären Matrix in entsprechenden Enzym-haltigen Lösungen inkubiert.

2.4.2 Versuchsablauf zur Bestimmung des Scherkraft-Effektes nach Devitellinisierung

Um den Einfluss der Vitellinhülle auf den Scherkraft (SK)-Effekt zu bestimmen, wurden ENaC-exprimierende Oozyten mechanisch devitellinisiert (vgl. Abschnitt 2.3.1). Direkt im Anschluss daran wurde die Reaktion auf Scherkraft elektrophysiologisch charakterisiert. Als Kontrolle dienten Oozyten, deren Vitellinhülle nicht entfernt wurde. Schematisch ist der Versuchsablauf in Abb. 8 dargestellt.

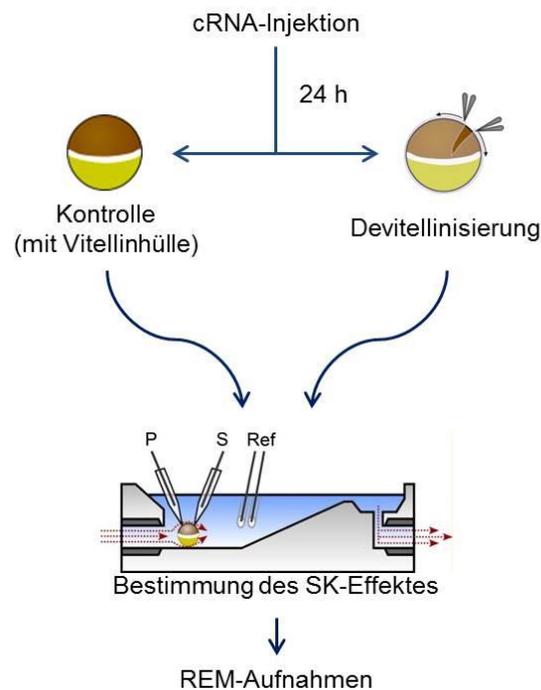


Abb. 8: Versuchsablauf zur Bestimmung des Einflusses der Vitellinhülle auf den SK-Effekt

24 Stunden nach Injektion der für den ENaC codierenden cRNA wurden Oozyten mechanisch devitelliniert und ihre Reaktion auf Scherkraft (SK) mittels TEVC charakterisiert. Als Kontrolle dienten Oozyten mit intakter Vitellinhülle. Direkt im Anschluss an die Messungen wurde die erfolgreiche Entfernung der Vitellinhülle mittels Rasterelektronenmikroskopischer (REM) Aufnahmen verifiziert.

2.4.3 Enzymatischer Abbau der Extrazellulären Matrix

Um Strukturen der Extrazellulären Matrix innerhalb des perivitellinen Spaltes abzubauen, bzw. zu entfernen, wurden Oozyten (sowohl mit, als auch ohne Vitellinhülle) in Enzym-haltigem KulORi inkubiert. Die hierfür eingesetzten Enzyme waren gegen verschiedene strukturelle Bestandteile der Extrazellulären Matrix gerichtet.

Hyaluronidase (Roth) gehört zur Klasse der Endoglykosidasen und besitzt sowohl hydrolytische, als auch transglykosidische Aktivität. Es spaltet neben dem negativ geladenen Polysaccharid Hyaluronsäure, welches ubiquitär in der Extrazellulären Matrix höherer Tiere vorkommt (Laurent und Fraser 1992), auch β -N-Acetylhexosamin-glykosidische Bindungen in Chondroitin und Chondroitin-Sulfaten (Lokeshwar *et al.* 2002). Hyaluronidase wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml (\cong 300 U/ml) eingesetzt. Der pH-Wert des KulORi wurde vor Zugabe des Enzyms durch Titration mit 1 M HCl auf pH 6 eingestellt. Anschließend wurden die Oozyten bei 30 °C für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Elastase (Sigma), ein in der Bauchspeicheldrüse von Wirbeltieren produziertes Verdauungsenzym gehört zur Klasse der Serinproteasen (Shirasu *et al.* 1987) und spaltet spezifisch das Strukturprotein Elastin. Elastin ist ein unlösliches, quervernetztes Strukturprotein, welches Geweben Elastizität verleiht (Mecham *et al.* 1997; Halper und Kjaer 2014). So ist es z.B. in Blutgefäßen für deren Dehnungsfähigkeit verantwortlich (Davis 1993). Um Elastin in der Extrazellulären Matrix der *Xenopus* Oozyten zu degradieren, wurde Elastase in einer Konzentration von 0,5 U/ml in KulORi mit einem pH von 8 gelöst. Die Oozyten wurden in die Elastase-haltige Lösung eingebracht und anschließend für 30 min bei einer Temperatur von 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.4.4 Versuchsablauf zur Charakterisierung des SK-Effektes nach enzymatischem Abbau der Extrazellulären Matrix

Zur Bestimmung des SK-Effektes nach enzymatischer Degradation der Extrazellulären Matrix wurden sowohl devitellinisierte, als auch Oozyten mit intakter Vitellinhülle in einer Enzymhaltigen Ringerlösung (vgl. Abschnitt 2.3.3) inkubiert. Als Kontrolle dienten jeweils native Oozyten, deren Extrazelluläre Matrix unbehandelt und damit intakt blieb. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abb. 9 dargestellt.

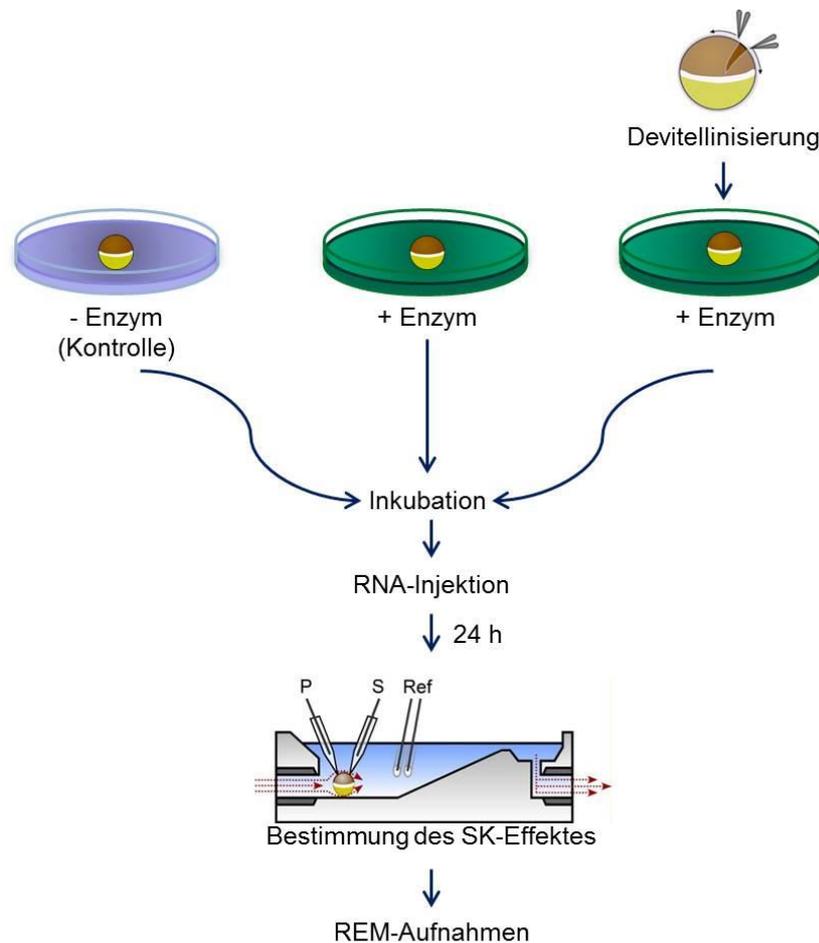


Abb. 9: Versuchsablauf zur Bestimmung des SK-Effektes nach enzymatischem Abbau der Extrazellulären Matrix

Nach mechanischer Devitelinisierung wurden die Oozyten in Enzym-haltiger Ringerlösung (+ Enzym) inkubiert. Anschließend wurde die für den ENaC codierende RNA injiziert. Nach 24 Stunden konnte der SK-Effekt des ENaC mittels TEVC-Messung bestimmt werden. Die Extrazellulären Matrix der so gemessenen Zellen wurde anschließend mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) visualisiert.

Erst anschließend an die Inkubation wurde in diese Oozyten die für den ENaC codierende RNA injiziert. So wurde sichergestellt, dass lediglich die Extrazelluläre Matrix degradiert wurde, die ENaCs selbst jedoch nicht mit dem Enzym in Kontakt kamen. Nach 24 Stunden konnte der SK-Effekt bestimmt werden. Die erfolgreiche Degradierung und damit eine Änderung in der optischen Beschaffenheit der Extrazellulären Matrix wurde auch hier durch REM-Aufnahmen der zuvor gemessenen Oozyten nachgewiesen.

3 Molekularbiologie

3.1 Herstellung der cRNA

3.1.1 Der Expressions-Vektor

Um den ENaC heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimieren zu können, musste zunächst die genetische Information für die einzelnen Untereinheiten mittels eines als *in vitro* Transkription bezeichneten Vorganges in codierende RNA (cRNA) umgeschrieben werden. Die codierenden Sequenzen für die humanen ENaC-Untereinheiten α , β , γ und δ (1 & 2) lagen als cDNA in jeweils einem Plasmid-Vektor vor (pTNT, PROMEGA, vgl. Abb. 10).

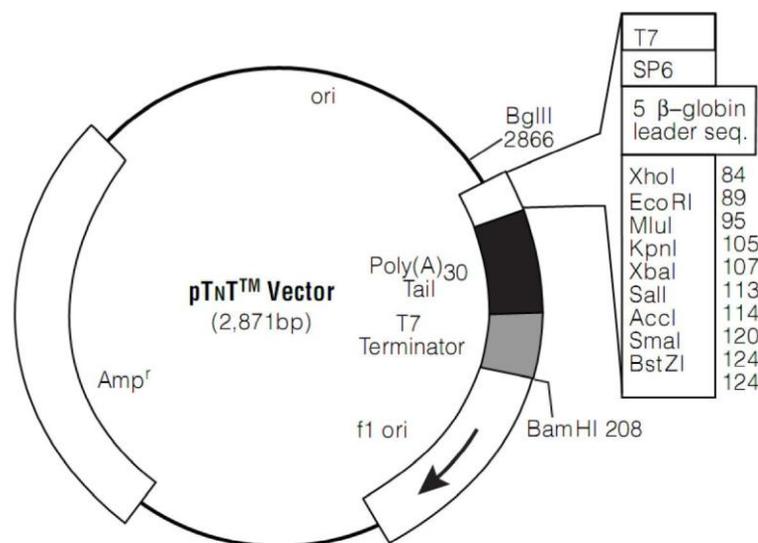


Abb. 10: Plasmidkarte des pTNT Vektors (Promega)

Dargestellt ist die Plasmidkarte des pTNT-Vektors. Dieser enthält zur Erhöhung der cRNA-Stabilität eine 5' β -globin leader Sequenz, sowie die genetische Information für einen Poly(A)-Schwanz.

bp: Basenpaare

Dieser Plasmid-Vektor ist zur Herstellung von cRNA für die anschließende heterologe Expression in *Xenopus* Oozyten besonders geeignet. Er enthält neben einem Ampicillin-Resistenzgen die Promotor-Bindesequenzen für gängige RNA-Polymerasen (T7 oder SP6), eine β -globin leader Sequenz, welche die Translationseffizienz der synthetisierten cRNA innerhalb der Zelle erhöht, sowie eine poly(A)-Sequenz (vgl. Abb. 10). Diese Polyadenylierung erhöht zum einen die Stabilität der cRNA und schützt sie gleichzeitig vor ihrem Abbau. Durch diese Modifikationen der cRNA wird eine effiziente und stabile Translation der ENaC-Untereinheiten in *Xenopus* Oozyten gewährleistet.

3.1.2 Amplifikation der Plasmid-DNA

Die Plasmide wurden zunächst über die Transformation in kompetente Bakterienzellen amplifiziert. Als kompetent bezeichnet man solche Bakterien, welche die Fähigkeit besitzen, im umgebenden Medium vorkommende freie DNA aufzunehmen. Nur wenige Bakterienstämme weisen eine sog. „natürliche Kompetenz“ auf und der in der vorliegenden Arbeit genutzte Darmbakterium-Stamm *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) gehört nicht dazu. Es ist jedoch mit Hilfe einer Calciumchlorid-Behandlung und anschließendem Hitzeschock möglich, eine künstliche Kompetenz dieser Bakterien zu erzeugen.

Für die Transformation der Plasmide in kompetente Bakterien wurde zunächst je 1 μ l des jeweiligen Plasmids in einem gekühlten, sterilen Eppendorf-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden 50 μ l der kompetenten Bakterien zugefügt und diese Ansätze für 20 min auf Eis inkubiert. Das darauf folgende 50sekündige Erhitzen der Proben auf 42 °C veranlasste die kompetenten *E. coli*-Zellen zur Aufnahme der Plasmid-DNA („Hitzeschock“-Transformation). Direkt im Anschluss wurden die so transformierten Bakterien für 2 Minuten auf Eis gestellt, anschließend 950 μ l LB-Medium (hergestellt aus 10 g LB-Medium (Sigma) gelöst in 500 ml ddH₂O) zugegeben und die transformierten Bakterien für 90 min bei 140 rpm und 37 °C auf einem Schüttler (Certomat HK, B. Braun) inkubiert, um sie zu vermehren.

Im Anschluss an die Inkubation wurden je 100 μ l der transformierten Bakterien auf Agarplatten ausplattiert, welche das Antibiotika Ampicillin in einer Konzentration von 70 μ g/ml enthielten. Dies stellte sicher, dass nur diejenigen Bakterien auf den Platten wachsen und Kolonien bilden konnten, welche das Plasmid (das - wie im obigen Abschnitt erwähnt - ein Resistenz-Gen für Ampicillin trägt) aufgenommen haben. Die ausplattierten Bakterien wurden kopfüber bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden mit Hilfe einer Impföse einzelne Bakterien-Kolonien „gepickt“ und in 10 ml eines Ampicillin-haltigen (70 μ g/ml) LB-Mediums überführt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 140 rpm und 37 °C auf dem Schüttler (Certomat HK, B. Braun) inkubiert, wodurch diejenigen Bakterien amplifiziert wurden, welche das Plasmid aufgenommen hatten.

3.1.3 Plasmidpräparation

Um die Plasmide aus den Bakterien zu isolieren, wurde eine sog. Plasmid-Präparation durchgeführt. Dabei wurden die Bakterienzellen aufgebrochen (lysiert) und die DNA mit Hilfe diverser Wasch-, Fäll- und Zentrifugationsschritte von den restlichen Zellbestandteilen separiert, bzw. aufgereinigt. Die Präparation erfolgte unter Zuhilfenahme des *PerfectPrep Miniprep Kits* von 5PRIME und wurde laut Gebrauchsanweisung des Herstellers durchgeführt.

Die auf diese Weise gewonnene Plasmid-DNA konnte anschließend für die *in vitro* Transkription zur Synthese von cRNA eingesetzt werden.

3.1.4 Linearisierung der Plasmid-DNA

Damit die *in vitro* Transkription und damit die Synthese der cRNA nach der Poly(A)-Sequenz endet, mussten die ringförmigen Plasmide vor der Transkription durch einen Restriktionsverdau linearisiert werden. Das Prinzip der Transkription nach Linearisierung der Plasmide wird auch als *run off*-Synthese bezeichnet. Für diesen Zweck ist im pTNT Vektor der Poly(A)-Sequenz eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamHI nachgeschaltet. Die Linearisierung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Tab. 2: Restriktionsansatz zur Linearisierung der Plasmide mit BamHI

Substanz	Menge (µl)
2 µg Plasmid-DNA	...
10-fach Puffer	3
BSA (bovines Serumalbumin)	0,3
RNAse freies Wasser	auffüllen auf 29
BamHI (Restriktionsenzym)	1
Gesamtvolumen	30

Die Proben wurden vor Zugabe des Restriktionsenzymes gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Nach Zugabe des Restriktionsenzymes wurden die Linearisierungsansätze für mind. 2 h bei 37 °C inkubiert. Die so linearisierte Plasmid-DNA wurde mittels einer Phenol/Chloroform-Extraktion von in der Probe enthaltenen Proteinen gereinigt.

3.1.5 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion beruht im Wesentlichen auf den unterschiedlichen Löslichkeiten von Nukleinsäuren (DNA/RNA) und Proteinen in einer zweiphasigen Emulsion. Während Proteine sich in der unteren, organischen Phase (Phenol/Chloroform) sammeln, löst sich die DNA, bzw. RNA in der oberen, wässrigen Phase und kann auf diese Weise separiert werden. Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde in *PLG-tubes* (*Phase-Lock-Gel-tubes*, 5PRIME) durchgeführt. Hierfür wurden die Linearisierungsansätze mit Nuklease-freiem H₂O auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt und dann der gesamte Ansatz in ein *PLG-tube* überführt. Es folgte die Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform (Sigma). Nach kurzem

Vermischen wurde der Ansatz bei Raumtemperatur für 5 min bei 15.000 g zentrifugiert. Es bildete sich eine untere, organische Phase. Diese enthielt die Proteine und war durch die Gelsubstanz der *PLG-tubes* von der darüber liegenden, wässrigen Phase getrennt. Diese wässrige Phase enthielt die linearisierte DNA. Um eventuell noch in der oberen Phase verbliebene Proteine zu entfernen und damit die Reinheit der Probe zu erhöhen, wurden nochmals 200 µl Phenol/Chloroform zur Probe gegeben. Die Ansätze wurden erneut vermischt und zentrifugiert (5 min/15.000 g/Raumtemperatur). Die daraufhin gebildete obere Phase mit der in ihr gelösten DNA wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt.

3.1.6 Ethanol-Präzipitation

Die darauffolgende Ethanol-Präzipitation (oder -Fällung) diente neben der Aufkonzentrierung der linearisierten Plasmid-DNA auch der Entfernung von Salzen, die bei der Fällung überwiegend in Lösung verblieben.

Zur Fällung der linearisierten Plasmid-DNA wurden ein 2,5faches Probenvolumen eiskalten 100%igen Ethanols, sowie 1/10 des Probenvolumens an eiskaltem 3 M Natriumacetat zugefügt. Die Proben wurden gut gemischt und für mind. 1h bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C gefällt. Da die Löslichkeit von DNA in einer weniger polaren Umgebung als in Wasser (hervorgerufen durch die Zugabe von Ethanol) deutlich vermindert ist, kam es in Folge zu einer Ausfällung der DNA. Das zusätzlich zugegebene Natriumacetat diente der Erniedrigung des pH-Wertes. Der so erzielte niedrige pH-Wert hält die normalerweise negativ geladene DNA im protonierten und damit ungeladenen Zustand, wodurch ihre Löslichkeit noch weiter gesenkt wird.

Die auf diese Weise gefällten Proben wurden dann bei 4 °C für 30 min bei 21.000 g zentrifugiert, was zu einer Pellettierung der ausgefallenen, linearisierten Plasmid-DNA führte. Der Überstand wurde möglichst vollständig mit einer Pipette abgezogen und verworfen. Anschließend wurden 500 µl eiskaltes 70%iges Ethanol vorsichtig am Rand des Eppendorf-Röhrchens hineinlaufen lassen und die Probe nochmals zentrifugiert (15 min / 21.000 g / 4 °C). Der Überstand wurde erneut abgezogen und das erhaltene Pellet bei geöffnetem Deckel unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurde das Pellet durch Zugabe von 11 µl Nuklease-freiem H₂O gelöst.

3.1.7 Überprüfung der Linearisierung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Ob die Linearisierung erfolgreich durchgeführt wurde, wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Bei erfolgreicher Linearisierung sollte je Probe nur eine prominente Bande (in der Größe der jeweiligen ENaC-Untereinheit + des Plasmid-Vektors) im Gel vorhanden sein. Bei nicht erfolgter Restriktion sollten drei verschiedene Banden sichtbar sein (*linear*, *coiled* und *supercoiled*).

Zunächst wurde ein 1%iges Agarose-Gel gegossen. Dazu wurden 0,8 g Agarose zu 80 ml 1x TAE-Puffer hinzugefügt und solange in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Die Agarose wurde für 5-10 min abkühlen gelassen und anschließend in die vorbereitete Gelelektrophorese-Kammer (*Mini Plus Submarine Gel*, ThermoFisher Scientific) gegossen. Auftretende Luftblasen wurden entfernt und der Kamm für die Probenauftragstaschen eingesteckt. Während das Gel aushärtete, wurden die Proben folgendermaßen mit dem Farbstoff *Midori Green direct* (Nippon Genetics Europe) versetzt:

Tab. 3: Probenansatz für die Gelelektrophorese

	Menge (µl)
Nuklease-freies Wasser	7,5
Linearisierte Plasmid-DNA	1
<i>Midori Green direct</i>	1,5
Gesamtvolumen	10

Der DNA-Marker (*1 kb DNA Ladder*, Biomol) wurde ebenfalls mit dem Farbstoff *Midori Green Direct* versetzt. Nach dem Aushärten des Gels wurde die Gelkammer mit 1x TAE-Puffer befüllt, die Proben in die Taschen aufgetragen und das Gel für ca. 1 Stunde bei 110 V gefahren. Die DNA konnte daraufhin mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.1.8 *in vitro* Transkription

Für die Umschreibung der linearisierten DNA in cRNA wurde das *RiboMAX™ Large Scale RNA Production System* von PROMEGA eingesetzt. Jeder Transkriptionsansatz wurde wie folgt zusammen pipettiert:

Tab. 4: Probenansatz zur *in vitro* Transkription

Substanz	Menge (μl)
<i>T7 Transcription Buffer</i> (5x)	4
Linearisierte Plasmid-DNA (1 μ g)	5
rNTPs	6
Nuklease-freies Wasser	1,5
<i>Cap</i> -Analog	1,5
Enzym T7	2
Gesamtvolumen	20

Die Proben wurden durch resuspendieren mit einer Pipette gut gemischt und kurz abzentrifugiert, bevor sie für 2-3 Stunden bei 37°C im Thermoblock inkubiert wurden. Im Anschluss an die Transkription wurde die *template* (Plasmid)-DNA durch Zugabe von 1 U/ μ g DNase (*RQ1 RNase-free DNase 1U/ μ l*, PROMEGA) und 15 minütige Inkubation bei 37 °C verdaut, der Ansatz anschließend durch Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe Abschnitt 3.1.4) von Proteinen gereinigt und die RNA mittels RNA-Reinigungssäulen (*QuickSpin Columns*, Roche) von nicht-inkorporierten Nukleotiden befreit. Zur Vorbereitung der RNA-Reinigungssäulen wurde das in den Säulen enthaltene Medium durch mehrfaches Aufschütteln resuspendiert. Anschließend wurde das untere Ende der Säule abgebrochen und diese auf ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen aufgesetzt. Die obere Kappe der Säule wurde nun ebenfalls entfernt und die Säule bei 4 °C für 5 min bei 1.100 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen aufgesetzt. Die durch die Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigte cRNA wurde auf die so präparierten RNA-Reinigungssäulen gegeben und die Proben bei 4 °C für 4 min bei 1.100 g zentrifugiert. Die Säulen wurden daraufhin verworfen und die im Durchfluss vorhandene cRNA mittels Ethanol-Präzipitation gefällt (vgl. Abschnitt 3.1.5). Die Fällungen wurden anschließend 30 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sauber abgezogen und verworfen. Zum anschließenden Waschen wurden 500 μ l eiskaltes 70 %iges Ethanol am Rand in das Röhrchen hineinlaufen lassen. Anschließend wurde der Ansatz nochmals für 15 min bei 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgezogen und die RNA-Pellets bei geöffnetem Deckel unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurden diese in 11 μ l Nuklease-freiem Wasser für 30 min gelöst. Die gelöste RNA konnte anschließend bei -80 °C aufbewahrt werden.

3.1.9 Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung der Transkription

Zur Kontrolle der cRNA-Synthese wurde jeder Ansatz auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Zum Anfärben der Proben wurde der Gel-Farbstoff *ROTI-Gelstain* (Roth) verwendet. Dieser Farbstoff wurde der abgekühlten Agarose hinzugefügt (4 µl pro 80 ml Agarose-Gel), bevor das Gel gegossen wurde. Nach erfolgreicher Transkription sollte jeweils nur eine prominente Bande (in der Größe der jeweiligen ENaC-Untereinheit) im Gel vorhanden sein. Um Sekundärfaltungen der cRNA zu verhindern, wurden die Proben vor der Gelelektrophorese denaturiert, indem sie für 10 min auf 70 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt wurden. Der Ansatz der Proben erfolgte nach folgendem Schema:

Tab. 5: Probenansatz zur elektrophoretischen Kontrolle der *in vitro* Transkription

	Menge (µl)
Nuklease-freies H ₂ O	4
2x RNA-Ladepuffer	5
Proben-RNA	1
Gesamtvolumen	10

Der verwendete RNA-Marker (*Riboruler*, Thermoscientific) wurde analog dazu vorbereitet:

Tab. 6: Ansatz des RNA-Markers

	Menge (µl)
Nuklease-freies Wasser	3
2x RNA-Ladepuffer	5
<i>RiboRuler</i> (Marker)	2
Gesamtvolumen	10

Die Proben wurden anschließend auf das Gel aufgetragen, welches mit 110 V für ca. 1 Stunde in 1x TAE Puffer gefahren wurde. Die RNA wurde im Anschluss daran mittels UV-Licht detektiert. Mit ca. 2 kb je Untereinheit entsprach die Größe der Banden den in der Literatur angegebenen Werten (Fronius *et al.* 2010; siehe Abb. 11).

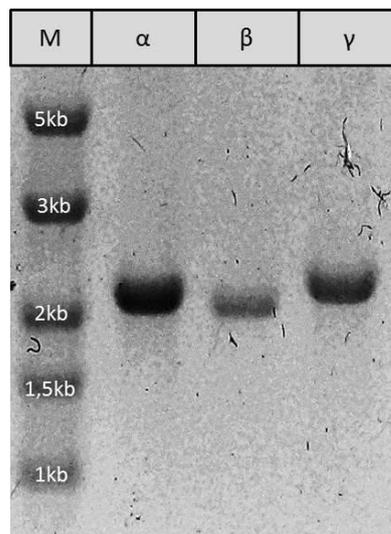


Abb. 11: cRNA der humanen ENaC-Untereinheiten

Die für die einzelnen Untereinheiten des humanen ENaC (α , β und γ) codierende cRNA wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert. Als RNA-Marker (M) diente die RNA-ladder *RiboRuler* von ThermoFisher Scientific. **kb**: Kilobasen.

Die RNA der einzelnen ENaC-Untereinheiten α , β , und γ wurden im Anschluss im Verhältnis 1:1:1 vermischt. Dazu wurde zunächst eine RNA-Stammlösung hergestellt, welche 1 μg RNA jeder Untereinheit in 5 μl Nuklease-freiem H_2O enthielt. Diese Stammlösung wurde anschließend im Verhältnis 1:20 mit Nuklease-freiem H_2O verdünnt. So wurde eine RNA-Lösung mit 10 ng RNA jeder Untereinheit in 1 μl H_2O erzeugt. Diese wurde aliquotiert und bis zur Injektion bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.1.10 Mikroinjektion der cRNA in *Xenopus* Oozyten

Die Injektion der cRNA wurde grundsätzlich mit Handschuhen durchgeführt, um eine mögliche Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Auch wurden nicht nur die Handschuhe, sondern auch die Arbeitsfläche und der Mikroinjektor (*3-00-203-XV*, *Nanoject*, Drummond Scientific) gründlich mit 70%igem Ethanol gereinigt. Des Weiteren wurden für alle Arbeitsschritte ausschließlich autoklavierte Pipettenspitzen und Eppendorf-Gefäße verwendet. Mit einem vertikalen Puller (*DMZ Universal Puller*, Zeitz) wurden Borosilikat-Glaskapillaren (Hilgenberg) ausgezogen und luftblasenfrei mit Mineralöl befüllt. Die Kapillare wurde auf die Nadel des Mikroinjektors aufgesteckt und arretiert, wobei auslaufendes Öl mit einem Ethanol-getränkten Tuch aufgefangen wurde. Nach dem Platzieren der Kapillare wurde das zugeschmolzene Ende mit Hilfe einer feinen Pinzette abgebrochen und die noch in der Spitze verbliebene Luft herausgedrückt. Zum Druckausgleich wurde die Spitze anschließend ca. 5 min in Mineralöl, das sich im Deckel eines Eppendorf-Gefäßes befand, platziert. Währenddessen wurde die in Nuklease-freiem H_2O gelöste, eingefrorene RNA des humanen

ENaC aufgetaut und die gewünschte Menge auf ein mit Parafilm überspanntes Zellkultur-Schälchen (NUNC) pipettiert. Der RNA-Tropfen wurde nun mit Hilfe des Injektors in die Glaskapillare aufgesogen, wobei darauf geachtet werden musste, dass keine Luft mit in die Spitze gelangte. Anschließend wurden die zu injizierenden Oozyten auf einem mit KulORi befüllten Injektionsschlitten platziert. Die Glaskapillare des Injektors wurde nun an die Zellen herangefahren und die Spitze in die Oozyten eingestochen. Es wurde jeweils ein Volumen von 32,2 nl injiziert, was einer Konzentration von 0,32 ng RNA jeder ENaC-Untereinheit pro Zelle entsprach. In Kontroll-Oozyten wurde das entsprechende Volumen an Nuklease-freiem H₂O injiziert.

Die injizierten Oozyten wurden bei 16 °C in NMDG-KulORi gelagert und 24-72 h nach der Injektion gemessen. Das Medium der im Brutschrank (*GTR 0214*, Memmert, Schwabach/Germany) aufbewahrten Oozyten wurde täglich gewechselt, bei dieser Gelegenheit wurden auch apoptotische Zellen entfernt. Für die Entsorgung der Oozyten wurden diese zunächst in verschließbaren Behältern mit 70%igem Ethanol gesammelt und anschließend über den organischen Abfall entsorgt.

3.2 Zielgerichtete Mutagenese der α - und δ -ENaC-Untereinheit

Mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese ist es möglich, Mutationen in die Aminosäuresequenz eines Proteins einzufügen, d.h. einzelne Aminosäuren des Proteins (hier des epithelialen Natriumkanals, ENaC) gegen andere auszutauschen (Substitution), zusätzlich einzufügen (Insertion) oder zu entfernen (Deletion). Änderungen in den funktionellen Charakteristika des so mutierten Kanals können anschließend unter Zuhilfenahme elektrophysiologischer Techniken, wie der *Zwei-Elektroden-Spannungsklemme* oder der *Patch-Clamp*-Technik charakterisiert werden und geben so direkte Rückschlüsse darauf, welche Rolle diese Aminosäure für die Funktionalität des Kanals spielt.

Die Mutagenese selbst erfolgt über gezieltes Verändern der Nukleotidabfolge der für den Kanal codierenden Sequenz mittels einer Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR). Dies führt im Zuge der anschließenden Translation zum Einbau der gewünschten Aminosäure in die Proteinsequenz.

In der vorliegenden Arbeit wurden in der α - und δ ENaC-Untereinheit gezielt mutmaßlich glykosylierte Asparagine (Asn, N) gegen Alanine (Ala, A) ausgetauscht. Als *template* diente die genetische Information für den Wildtyp- α -, bzw. δ 1ENaC, welche jeweils im Expressionsvektor pTNT (PROMEGA) vorlag (vgl. Abb. 12). Um die codierende Sequenz zu mutieren, wurden mit Hilfe einer speziellen Software (*Primer Design Tool*, Agilent Technologies) Mutagenese-Primer-Paare designt (jeweils *sense* und *antisense*), welche die gewünschte Mutation

trugen. Diese Primer mussten spezielle Anforderungen erfüllen, z.B. sollten sie eine Mindestlänge von 25 Basenpaaren (bp) und eine Schmelztemperatur von ≥ 78 °C besitzen. Außerdem sollte die gewünschte Mutation möglichst mittig im Primer lokalisiert sein.

3.2.1 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR selbst besteht aus 20 Zyklen, jeweils bestehend aus 3 verschiedenen Abschnitten.

1. Während der **Denaturierung** (*Melting*, bzw. Schmelzen) werden die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden DNA-Strängen der doppelsträngigen Wildtyp-Plasmide (*DNA-template*) durch Erhitzen aufgebrochen. Dadurch kommt es zu einer Trennung der doppelsträngigen Plasmid-DNA, so dass sich im zweiten Schritt, dem
2. **Annealing**, die Primer mit den gewünschten Mutationen (Mutagenese-Primer) anlagern können (vgl. Abb. 12). Dies geschieht durch Absenken der Temperatur auf einen Wert, der eine spezifische Anlagerung der Primer an das *template* erlaubt und welcher neben der Länge der Primer auch durch deren Sequenz bestimmt wird. Die Mutagenese-Primer werden anschließend während der
3. **Elongation** verlängert, das heißt, die Primer werden nicht wieder abgelöst, sondern bilden den Anfang des neu synthetisierten Einzelstranges. Dieser wird durch die DNA-Polymerase mittels Anlagerung von freien Nukleotiden verlängert, was letztlich zur Bildung eines DNA-Stranges führt, der sich außer in der gewünschten Mutation nicht von der Ursprungs-DNA unterscheidet.

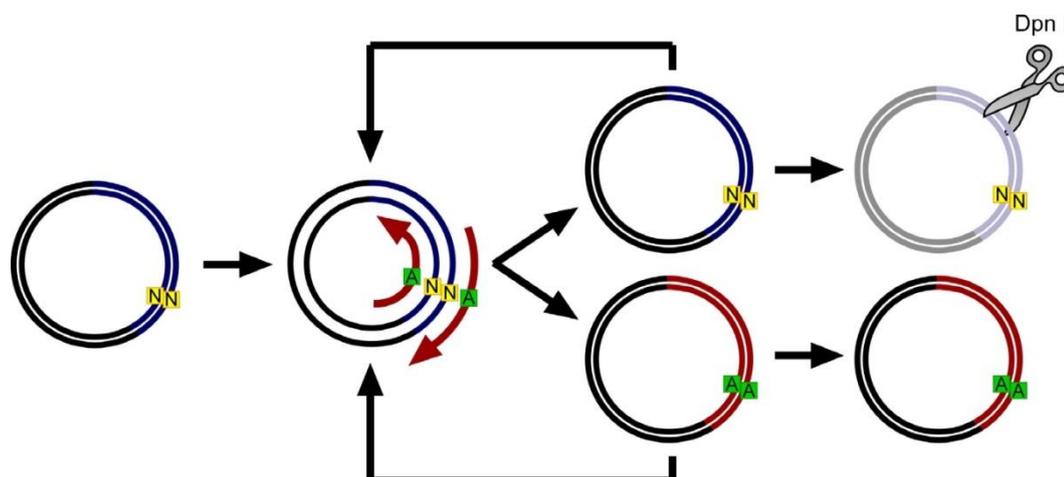


Abb. 12: Schematische Darstellung der Mutagenese-PCR

Als *template* für die Mutagenese-PCR diente der Expressionsvektor pTNT von PROMEGA (dargestellt in schwarz), welcher die codierende Sequenz für den Wildtyp- α -, bzw. δ ENaC enthielt (blau). Um Asparagine (N, gelb) gegen Alanine (A, grün) zu substituieren, wurden Mutagenese-Primer generiert (rot), welche die genetische Information für diese Mutation trugen. Diese lagerten sich im Zuge der Mutagenese-PCR an die *template*-DNA an und dienten als Anfangssequenz für die Synthese neuer DNA, welche sich lediglich durch die gewünschte Mutation von der Ursprungssequenz unterschied (rot). Durch Wiederholung der PCR-Zyklen wurde die so mutierte Plasmid-DNA amplifiziert, während das *template* durch Zugabe des Enzyms DpnI im Anschluss an die PCR verdaut wurde.

Durch das mehrmalige Wiederholen der Zyklen wird die Anzahl der mutierten Plasmide exponentiell amplifiziert. Die Mutation des α -, bzw. δ ENaC wurde mit Hilfe des *QuikChange Lightning Site-directed Mutagenesis-Kits* (Agilent) durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Mutagenese-Primer sind in Tab. 7 und 8 gelistet. Doppel-, bzw. Dreifach-Mutationen wurden sequentiell erzeugt.

Tab. 7: Primersequenzen für die Mutation des humanen α ENaC

Name		Sequenz (5' - 3')
N232A	<i>sense</i>	ctccagctgtgcaaccaggccaaatcggactgcttctac
	<i>antisense</i>	gtagaagcagtccgatttggcctggttgacacagctggaag
N293A	<i>sense</i>	tctcctgcaaccaggcggcttactctcacttcacc
	<i>antisense</i>	ggtggaagtgagagtaagccgctggttgacaggaga
N312A	<i>sense</i>	tgctatacttcaatgacaaggccaactccaacctctggatgc
	<i>antisense</i>	gacatccagaggttgagttggccttgctattgaaagtatagca
N397A	<i>sense</i>	atggcgactgcaccaaggctggcagtgatgttctg
	<i>antisense</i>	caggaacatcactgccagccttggtgagtcgcat
N511A	<i>sense</i>	gatgctatcgacagaaacgcttacaccgtcaacaacaag
	<i>antisense</i>	ctgtgttgtagcgggtgaagcgttctgtcgcatagcatc

Tab. 8: Primersequenzen für die Mutation des humanen $\delta 1\text{ENaC}$

Name		Sequenz (5' - 3')
N166A	<i>sense</i>	actccctgtacaacgctcgccctcagcaaaggcagag
	<i>antisense</i>	ctctgccttgctgagggcgacgtgtacagggagt
N232A	<i>sense</i>	ggttcagactgtgcccagcacgggcgggcg
	<i>antisense</i>	cgccgcccgtgctggcgcacagtctgaacc
N348A	<i>sense</i>	ggtggagctgctacacgccacctcctacaccagg
	<i>antisense</i>	cctggtgtaggaggtggcgtgtagcagctccacc

Der Ansatz der Mutagenese-PCR wurde nach folgendem Schema zusammen pipettiert:

Tab. 9: Proben-Ansatz für Mutagenese-PCR

	Menge
10 x Reaktionspuffer	5 μl
<i>template</i> -DNA	100 ng
Primer (<i>sense</i>)	125 ng
Primer (<i>antisense</i>)	125 ng
dNTP-mix	1 μl
<i>QuikSolution</i>	1,5 μl
Nuklease-freies H ₂ O	Auffüllen auf 49 μl
<i>QCL</i> -Enzym	1 μl
Gesamtvolumen	50 μl

Nach dem Mischen und Abzentrifugieren des Ansatzes wurde 1 μl der Polymerase (*QuikChange Lightning Enzym, Agilent*) hinzugefügt, die Proben in einen Thermocycler (*TProfessional Basic; analytikjena*) überführt und die Mutagenese-PCR nach folgendem Schema gestartet:

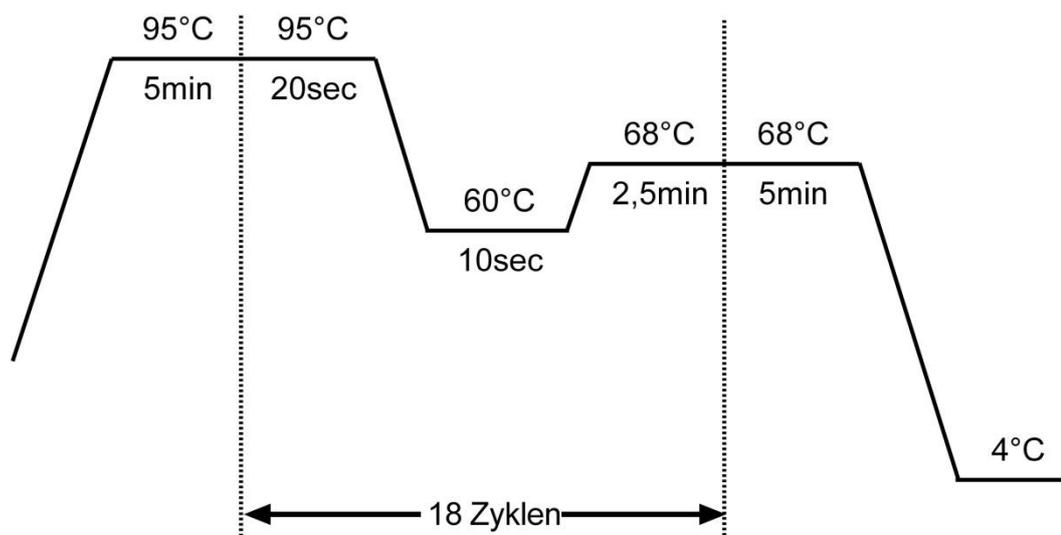


Abb. 13: Temperatur-Zeit-Schema der Mutagenese-PCR

Schematisch dargestellt ist der zeitliche Ablauf der Mutagenese-PCR zur zielgerichteten Mutagenese einzelner Asparagine der α , bzw. δ 1ENaC-Untereinheit.

Um im Anschluss die noch im Reaktionsansatz vorhandene Wildtyp-DNA (*template*) zu degradieren, wurden die Reaktionsansätze nach Beendigung der PCR mit dem Enzym DpnI behandelt. Hierbei handelt es sich um eine Endonuklease, welche ausschließlich methylierte und hemimethylierte DNA spaltet. Da die PCR-Produkte (mutierte Plasmide) nicht methyliert wurden, werden diese durch die Enzymbehandlung nicht abgebaut und auf diese Weise selektioniert. Nach der Zugabe von 2 μ l DpnI wurden die PCR-Produkte für 5 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss daran sofort auf Eis gestellt.

Die Amplifikation der mutierten Plasmide erfolgte *via* Transformation in kompetente Bakterien (vgl. Abschnitt 3.1.2) mit anschließender Plasmidpräparation (vgl. Abschnitt 3.1.3). Die so gewonnenen Plasmide wurden zum Sequenzieren eingesandt (*Eurofins*, Ebersberg). Plasmide, welche nachweislich die gewünschte Mutation trugen, wurden mittels Restriktionsverdau mit BamHI linearisiert und anschließend als *template* für die *in vitro* Transkription (vgl. Abschnitt 3.1.7) genutzt. Auf diese Weise wurde die cRNA des mutierten α - und δ 1ENaC gewonnen. Diese wurde im Anschluss jeweils in Kombination mit für die Wildtyp- β -, bzw. γ ENaC-Untereinheiten codierenden cRNA in Oozyten injiziert (im Verhältnis 1:1:1) und der mutierte Kanal so zur Expression gebracht. Auf diese Weise konnte der mutierte ENaC elektrophysiologisch (mittels TEVC und *Patch Clamp*) und molekularbiologisch (*Western Blot*) charakterisiert werden.

3.3 Nachweis der Glykosylierung des α ENaC mittels Western Blot

Die Methode des Western Blot wurde im Jahre 1979 entwickelt (Renart *et al.* 1979; Burnette 1981) und dient dem spezifischen Nachweis von einzelnen Proteinen in einem Proteingemisch. Mit Hilfe dieser Methode sollte der α ENaC in Ganzzell-Proteinextrakten, welche aus *Xenopus* Oozyten gewonnen wurden, detektiert werden. Für diese Experimente wurde ein α ENaC in *Xenopus* Oozyten exprimiert, welcher an seinem C-Terminus mit einem Hämagglutinin-Epitop (HA-*tag*) markiert war. Diese ursprünglich aus einem Oberflächen-Glykoprotein des humanen Influenza-Virus gewonnene Peptidsequenz besitzt folgende codierende Basensequenz:

5'-TACCCATATGACGTTCCAGACTACGCC-3'

Die genetische Information für den HA-*tag* schließt im Expressionsvektor (pTNT, PROMEGA) *downstream* an diejenige für den α ENaC an. Dies führt dazu, dass der HA-*tag* bei der Expression des α ENaC in die Peptidsequenz **YPYDVPDYA** co-translatiert wird, welche dem C-Terminus des α ENaC angehängt ist. Ein gegen diesen HA-*tag* gerichteter Antikörper ermöglicht eine spezifische Detektion des α ENaC.

Das Plasmid, welches die codierende Sequenz für den so *getaggten* Wildtyp(Wt)- α ENaC im pTNT-Expressionvektor (PROMEGA) trägt, wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Alvarez de la Rosa (*University of La Laguna*, Department of Physiology, Spain) zur Verfügung gestellt und diente zunächst als *template* für die Mutagenese-PCR.

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden - analog zu den vorhergehenden Experimenten (vgl. Abschnitt 3.2.1) - die Asparagine 312 und 511 in der Extrazellulären Domäne des HA-*getaggten* α ENaC gegen Alanine substituiert. Auf diese Weise wurden sowohl Einzel-Mutanten (HA- α N312A und HA- α N511A), sowie eine Doppel-Mutante (HA- α N312+511A) des α ENaC generiert, welche mit einem HA-*tag* versehen und somit nach erfolgreicher Expression in Oozyten mittels Western Blot detektiert werden konnten. Im Anschluss an die Mutagenese-PCR wurde die genetische Information, sowohl des HA-Wt α ENaC, als auch der Einzel- und Doppel-Mutante(n) zunächst mittels *in vitro*-Transkription in cRNA umgeschrieben und anschließend jeweils in Kombination mit der β - und γ -Untereinheit heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert (injizierte RNA-Menge: 0,32 ng pro Untereinheit).

3.3.1 Lyse der Oozyten zur Proteingewinnung

Die injizierten Oozyten wurden zur Expression des HA-getaggen ENaC für 48 Stunden in NMDG-KulORi kultiviert und anschließend in Lysepuffer (10 µl pro Oozyte) homogenisiert. Dafür wurde die jeweils benötigte Menge des Lysepuffers in einem Eppendorf-Röhrchen vorgelegt und direkt vor der Zugabe der Oozyten mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (*Complete Mini-EDTA-free protease Inhibitor mixture tablets*, Roche Diagnostics) im Verhältnis 1:10 versetzt. Der Protease-Inhibitor-Cocktail wurde im Vorfeld als 10fach konzentrierte Stammlösung hergestellt, indem eine Tablette in 1 ml Lysepuffer gelöst wurde. Zu dem Lysepuffer wurden im Anschluss die Oozyten hinzugefügt. Hierbei wurde sorgfältig darauf geachtet, lediglich die Oozyten, nicht aber den NMDG-KulORi zu überführen.

Insgesamt wurden 5 verschiedene Ansätze gebildet:

- 1) Wildtyp HA- $\alpha\beta\gamma$ ENaC
 - 2) HA- α N312A $\beta\gamma$ ENaC
 - 3) HA- α N511A $\beta\gamma$ ENaC
 - 4) HA- α N312+511A $\beta\gamma$ ENaC (Doppel-Mutante)
 - 5) Native Oozyten
- } Einfach-Mutanten

Die Lyse der Zellen selbst erfolgte durch mehrmaliges resuspendieren der Oozyten durch eine gelbe Pipettenspitze. Um die in der Oozyte enthaltenen Proteine zu extrahieren, wurde das Homogenat anschließend bei 1.000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Dies resultierte in der Bildung von drei unterschiedlichen Phasen. Zelltrümmer sammelten sich als festes Pellet am Boden des Eppendorf-Röhrchens, wasserlösliche Bestandteile (u.a. Proteine) waren in der mittleren, klaren Phase zu finden, während Dotter und Fett die oberste Phase bildeten (vgl. Abb. 14).

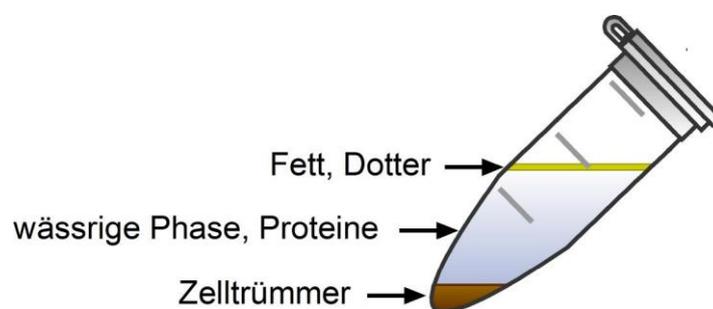


Abb. 14: Fraktionierung des Oozyten-Extraktes

Schematische Darstellung eines Eppendorf-Röhrchens nach Lyse und Zentrifugation von *Xenopus* Oozyten in Lyse-Puffer. Durch Zentrifugation des Homogenats bildeten sich drei unterschiedliche Phasen. Während Zelltrümmer ein festes Pellet am Boden des Gefäßes bildeten, waren wasserlösliche Bestandteile (wie etwa Proteine) in der wässrigen, mittleren Phase zu finden. Fett, bzw. Dotter bildeten die oberste Phase.

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Mittels einer feinen Spritzenkanüle wurde die mittlere (wässrige) Phase abgesaugt und in ein frisches, vorgekühltes Eppendorf-Röhrchen überführt. Dabei wurde darauf geachtet, möglichst keine Fette oder Dotter aus der obersten Phase mit zu überführen. Um eine optimale Aufreinigung des Proteinextraktes zu gewährleisten, wurde das Lysat nochmals zentrifugiert (1.000 g/ 10 Minuten / 4 °C) und wiederum die wässrige Phase isoliert. Dieser Schritt wurde bei Bedarf so oft wiederholt, bis sich nach der Zentrifugation keine sichtbaren Fette mehr auf der Probenoberfläche befanden. Im Anschluss daran wurde die in den Proben enthaltene Proteinkonzentration mittels *Bradford-Assay* bestimmt.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels *Bradford-Assay*

Der *Bradford-Assay* ist eine photometrische Methode, welche die quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen in einer Lösung erlaubt (Bradford 1976). Er basiert auf der Bindung des Farbstoffs *Coomassie-Brilliant-Blau G-250* an Proteine. Durch diese Komplexbildung kommt es zu einer Verschiebung im Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm (in ungebundener Form) zu 595 nm (in komplexierter Form). Für die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wird daher die Absorption bei 595 nm photometrisch bestimmt und mit derjenigen des ungebundenen, freien Farbstoffs verglichen. Die Zunahme der Absorption bei dieser Wellenlänge ist daher ein direktes Maß für die in der Probe enthaltene Proteinkonzentration.

Zur Kalibrierung wurde eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen des Proteins BSA (Bovines Serum-Albumin) erstellt. Hierfür wurden je 20 µl BSA in den Konzentrationen 0, 10, 50, 100, 200 und 500 µg/µl in einer *Multiwell*-Platte vorgelegt.

Die aus den lysierten Zellen gewonnenen Proteinextrakte wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt und ebenfalls zu je 20 µl in die *Multiwell*-Platte pipettiert. Um Ungenauigkeiten zu vermeiden, wurde jede Probe (sowohl die BSA-Standards, als auch die zu untersuchenden Proteinextrakte) jeweils dreifach vorgelegt, um die gemessene Absorption im Anschluss mitteln zu können. Eine schematische Übersicht ist in Abb. 15 dargestellt.

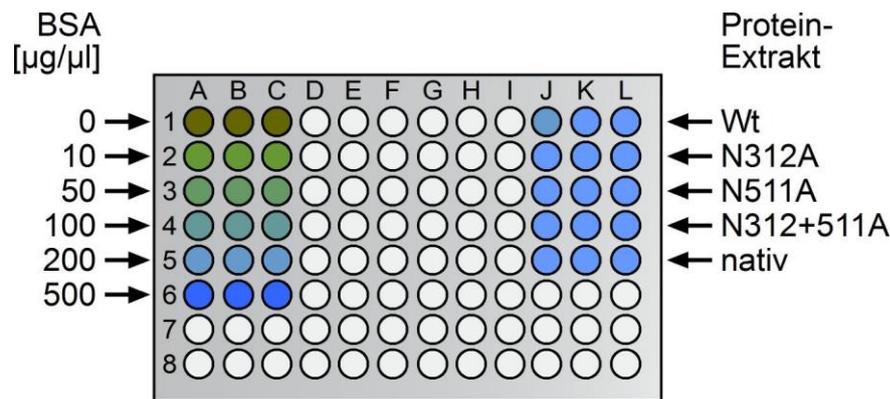


Abb. 15: Pipettierschema für den Bradford-Assay

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde BSA (Bovines Serum Albumin) in standardisierten Mengen von 0 bis 500 µg/µl in die ersten drei Reihen einer 96-Well-Platte vorgelegt. Die zu bestimmenden Proben der Oozyten-Extrakte wurden in den letzten drei Reihen aufgetragen. Die Zugabe des Farbstoffs *Coomassie-Brilliant-Blau G-250* resultierte in einem Farbumschlag zu blau, dessen Ausmaß in direktem Verhältnis zu der in der Probe enthaltenen Proteinmenge stand. Wt: Wildtyp, N312A und N511A: Proteinextrakte von Oozyten, welche die Einzelmutanten des α ENaC, sowie die Doppel-Mutante (N312+511A) exprimierten. nativ: Proteinextrakt aus nativen Oozyten.

Anschließend wurden jeder Proteinprobe 200 µl *Bradford-Solution* (Appllichem) zugefügt. Nach kurzer Wartezeit von etwa 5 Minuten wurde die Absorption bei 595 nm gemessen (*Microplate Autoreader EL309*, BIO-TEK INSTRUMENTS) und mit Hilfe der Eichkurve die in den Proben enthaltene Proteinkonzentration ermittelt. Für den nachfolgenden Western Blot wurden von jeder Probe jeweils 30 µg Protein eingesetzt. Der Rest der Proteinproben wurde bei -80 °C eingefroren.

3.3.3 Enzymatische Behandlung mit PNGase F und Hyaluronidase

PNGase F: Mittels Western Blot sollten Unterschiede im Glykosylierungsstatus zwischen dem Wt α ENaC und den entsprechenden Asparagin-Mutanten detektiert werden. Der Wt α ENaC sollte daher mittels enzymatischer Behandlung vollständig deglykosyliert werden. Hierzu wurde das Enzym PNGase F (Peptid-N⁴-(N-acetyl- β -glucosaminy)-Asparagin-Amidase F) eingesetzt (New England Biolabs). Diese aus dem *Flavobacterium meningosepticum* isolierte Endoglykosidase spaltet spezifisch die glykosidische Bindung von N-Acetylglucosamin an Asparagine. Auf diese Weise wird nicht nur das Oligosaccharid, sondern auch das vollständig deglykosylierte Protein freigesetzt. Die Behandlung mit PNGase F diente somit als Positiv-Kontrolle für die erfolgreiche Abspaltung aller Zuckerreste des Wt- α ENaCs. Dies ermöglichte den Vergleich hinsichtlich des Glykosylierungsstatus mit den Mutanten.

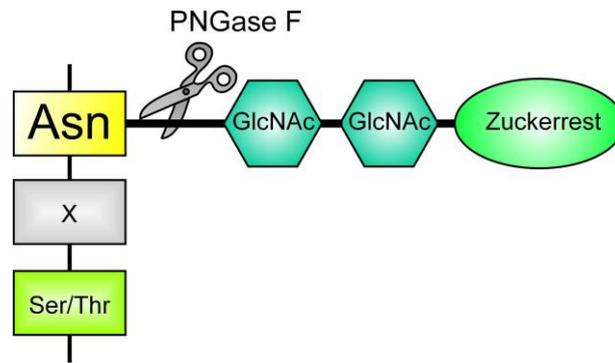


Abb. 16: Deglykosylierung eines N-glykosylierten Asparaginrestes durch PNGase F

Asparagine, welche innerhalb der Konsensussequenz Asn (Asparagin) - X (beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Prolin) - Ser/Thr (Serin oder Threonin) vorliegen, können glykosyliert vorliegen. Die Endoglykosidase PNGase F trennt spezifisch die N-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und Asparagin.

Um eine restlose Abspaltung aller N-glykosidisch gebundenen Zuckerrreste durch PNGase F sicherzustellen, musste gewährleistet sein, dass das Enzym auch alle Glykosylierungsstellen effektiv erreichen kann. Dies kann durch die Sekundär-, bzw. Tertiärstruktur des Proteins erschwert werden, da das Enzym auf Grund sterischer Gegebenheiten am Zugang zur Schnittstelle gehindert werden kann. Zu diesem Zweck wurden 30 µg des Wt-Proteinextraktes zunächst denaturiert. Durch das Denaturieren der Proteine wird deren Sekundär- bzw. Tertiärstruktur aufgebrochen, ohne dass die Primärstruktur (Aminosäureabfolge) verändert wird. Im Anschluss an die Denaturierung liegen die Proteine demzufolge als langkettige Aminosäuresequenz vor, so dass das Enzym ungehinderten Zugang zu den Glykosylierungsstellen hat.

Hierfür wurde der Wt-Proteinextrakt mit 1 µl Denaturierungspuffer (New England Biolabs) versetzt, das Probenvolumen mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt und anschließend für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Im Anschluss an die Denaturierung wurde die Probe für 3 Minuten auf Eis gestellt und daraufhin abzentrifugiert. Anschließend wurde NP-40 (*Nonyl phenoxypolyethoxyethanol* 40) zugefügt. Hierbei handelt es sich um ein nicht-ionisches Detergenz, welches das im Denaturierungspuffer enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) daran hindert, die PNGase F zu inhibieren. Des Weiteren wurden der Reaktionspuffer sowie die PNGase F entsprechend dem folgenden Schema zugefügt:

Tab. 10: Reaktionsansatz für die Deglykosylierung mit PNGase F

Substanz	Menge [μ l]
Denaturierter Wt-Proteinextrakt	10
NP-40	2
Reaktions-Puffer (10x)	2
PNGase F	2
H ₂ O	4
Gesamt-Volumen	20

Wt: Wildtyp- α ENaC**NP-40:** Nonyl phenoxypolyethoxyethanol 40**PNGase F:** Peptid-N⁴-(N-acetyl- β -glucosaminyl)-Asparagin-Amidase F

Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37 °C wurde der Probe ein Ladepuffer (*Rotiload 1*, Roth) im Verhältnis 1:4 beigemischt und die Probe anschließend bis zum Gelauftrag auf Eis gekühlt.

Hyaluronidase: Konform mit dem zuvor beschriebenen Vorgehen wurde eine zweite Probe des Wt-Proteinextraktes (30 μ g) mit dem Enzym Hyaluronidase (Roth) behandelt. Hierfür wurde der Probe im Anschluss an die Denaturierung Hyaluronidase in einer Endkonzentration von 1 mg/ml (\cong 300 Units/ml) zugefügt. Auch hier wurde dem Reaktionsansatz NP-40 zugesetzt, um eine Inhibierung des Enzyms durch SDS zu verhindern.

Tab. 11: Reaktionsansatz für die Deglykosylierung mit Hyaluronidase

Substanz	Menge [μ l]
Denaturierter Wt-Proteinextrakt	10
NP-40	2
Hyaluronidase (300 U/ml)	6
H ₂ O	2
Gesamt-Volumen	20

Wt: Wildtyp- α ENaC**NP-40:** Nonyl phenoxypolyethoxyethanol 40

Der so behandelte Proteinextrakt wurde ebenfalls für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, bevor 4fach konzentrierter Ladepuffer (*Rotiload 1*, Roth) im Verhältnis 1:4 hinzugegeben und die Probe auf Eis gestellt wurde.

3.3.4 Probenvorbereitung und Gel-Auftrag

Die Proteinextrakte, welche keiner enzymatischen Behandlung unterzogen wurden, wurden vor dem Gelauftrag ebenfalls mit Ladepuffer (*Rotiload 1*, Roth) versetzt und anschließend für 5 Minuten bei 85 °C denaturiert. Das im Ladepuffer vorhandene β -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken in Proteinen zu freien Thiolen und führt so in Kombination mit der Hitze zu einer Denaturierung und damit Linearisierung der Proteine. Dies ist insofern wichtig, als dass die Linearisierung der Proteine eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Kettenlänge erlaubt (längere Proteine laufen langsamer durch das Gel als kürzere). Nach der Denaturierung wurden die Proben für einige Minuten auf Eis gestellt und anschließend kurz abzentrifugiert. Alle Proteinproben wurden daraufhin gemeinsam mit einem Proteinmarker (*Precision Plus Protein Dual Color Standards*, BIO RAD) auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

3.3.5 SDS-PAGE

Der Begriff SDS-PAGE steht für *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese* und bezeichnet ein in der Proteinbiochemie zur Auftrennung und Analyse von Proteinen eingesetztes Verfahren. Das zur Auftrennung eingesetzte Gel wirkt dabei ähnlich wie ein Sieb. Größere Proteine werden in seinen Poren eher zurückgehalten und migrieren daher mit geringerer Geschwindigkeit durch das Gel hindurch als kleinere. Das im Gel enthaltene anionische Detergenz SDS bindet an die aufzutrennenden Proteine und überdeckt deren Eigenladung gleichmäßig durch seine konstant negative Ladung. Dies wiederum hat zwei Dinge unmittelbar zur Folge: Zum einen induziert die negative Ladung des SDS eine gegenseitige Abstoßung, so dass die Proteine in ihrer linearisierten Form verharren. Zum anderen erlaubt es die korrekte und gleichmäßige Auftrennung der Proteine durch das Anlegen einer elektrischen Spannung.

Zunächst wurde ein SDS-haltiges Gel auf Polyacrylamid-Basis gegossen, welches aus zwei unterschiedlichen Komponenten besteht, dem Sammel- und dem Trenngel. Diese beiden Gel-Komponenten unterscheiden sich sowohl in Hinsicht auf ihre Porengröße, als auch durch ihren pH-Wert und ermöglichen damit die Durchführung einer sogenannten diskontinuierlichen SDS-PAGE. Bei dieser Methode migrieren die Proteine zunächst durch das Sammelgel mit neutralem pH-Wert, um anschließend im darunterliegenden, basischen Trenngel aufgetrennt zu werden. An der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel kommt es auf Grund des pH-Gradienten und der unterschiedlichen Porengröße zu einem Stapelungseffekt und damit der Aufkonzentrierung der Proteinproben. Zunächst wurde das Trenngel nach dem in Tab. 12 aufgelisteten Rezept hergestellt:

Tab. 12: Zusammensetzung des SDS-Trenngels

Substanz	Menge
ddH ₂ O	7,4 ml
30% Acrylamid/Bis	4,2 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	4,0 ml
10 % SDS	160 µl
10 % APS	160 µl
TEMED	8 µl

ddH₂O: doppelt-distilliertes Wasser;
Tris: Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan;
SDS: Natriumdodecylsulfat;
APS: Ammonium Persulfat;
TEMED: Tetramethylethylenediamine

Wasser, Acrylamid, Tris ((Hydroxymethyl)-Aminomethan) und SDS (Natriumdodecylsulfat) wurden in einem Becherglas vorgelegt und durch kurzes Schwenken miteinander vermischt. APS (Ammonium Persulfat) und TEMED (Tetramethylethylenediamine) wurden anschließend zugefügt. Diese beiden Substanzen katalysieren die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid, und induzieren damit die Aushärtung des Gels. Diese Gelsubstanz wurde anschließend in zuvor präparierte Gelkammern gegossen und direkt im Anschluss mit 100%igem Isopropanol überschichtet. Hierdurch bildete sich ein sauberer, waagerechter Abschluss des Trenngels. Nach dessen Aushärtung wurde das Isopropanol durch Ausgießen entfernt, das Sammelgel gegossen (vgl. Tab. 13) und auf das ausgehärtete Trenngel geschichtet. Durch das Einstecken spezieller Kämme wurden die Taschen für den späteren Probenauftrag geschaffen.

Tab. 13: Zusammensetzung des SDS-Sammelgels

Substanz	Menge
ddH ₂ O	5,4 ml
30% Acrylamid/Bis	1,3 ml
0,5 M Tris, pH 6,8	1,0 ml
10 % SDS	80 µl
10 % APS	80 µl
TEMED	8 µl

ddH₂O: doppelt-distilliertes Wasser;
Tris: Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan;
SDS: Natriumdodecylsulfat;
APS: Ammonium Persulfat;
TEMED: Tetramethylethylenediamine

Die darauf folgende SDS-PAGE wurde in einer Elektrophorese-Kammer (*Mini PROTEAN Tetra System*, BIO RAD) durchgeführt, welche mit einem *SDS-Running Buffer* gefüllt war (vgl. Tab. 15). Die Aufkonzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte für ca. 30 Minuten bei einer Spannung von 60 V, während die Auftrennung für ca. 3 Stunden bei 110 V durchgeführt wurde.

3.3.6 Western Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (*Nitrocellulose Membranes 0,45 μ m*, BIO-RAD) übertragen. Hierfür wurde ein spezieller *Blotting-Buffer* verwendet, dessen Zusammensetzung in Tab. 16 angegeben ist. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte durch das 60minütige Anlegen einer Spannung von 110 V.

Um die restlichen Bindestellen der Membran zu blockieren und so eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran im Anschluss an den Protein-Transfer für mindestens 1 Stunde in einer 5%igen BSA-TBST-Lösung (siehe Tab. 17) auf einem Schüttler (*MTS4*, IKA) inkubiert.

Nun folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, welcher gegen den C-terminalen HA-tag des α ENaC gerichtet war (*HA Epitope Tag Antibody*, ThermoFisher Scientific). Dieser wurde im Verhältnis 1:10.000 in 5%iger BSA/TBST-Lösung gelöst und die Membran in dieser Antikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C schüttelnd inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran für mindestens 30 min in TBST gewaschen, wobei das Medium alle 10 min erneuert wurde. Anschließend folgte eine 60minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (*PierceRabbit Anti-Mouse IgG, (H+L), Peroxidase Conjugated*, Thermo Scientific). Dieses gegen den primären Antikörper gerichtete Immunglobulin wurde in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt und ist mit dem Enzym Peroxidase konjugiert. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran erneut für 3 x 10 Minuten in TBST gewaschen, bevor die Membran für 3 Minuten mit einer speziellen Luminol-haltigen ECL (*Enhanced chemiluminescence*)-Substratlösung inkubiert wurde (siehe Tab. 18+19). Das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym Peroxidase setzt Luminol in Anwesenheit von Wasserstoff-Peroxid dahingehend um, dass ein Anion im angeregten Zustand entsteht. Dies emittiert beim Zurückfallen vom angeregten Zustand auf den Grundzustand Licht, welches wiederum zur Belichtung eines Filmes (*Amersham Hyperfilm ECL*, GE Healthcare) führt. Durch dieses chemolumineszierende Verfahren wird der Film ausschließlich an solchen Stellen geschwärzt, an denen der HA- α ENaC auf der Membran vorliegt, was den spezifischen Nachweis dieser Untereinheit erlaubt.

Die so belichtete Membran wurde in Entwickler-Lösung (*GBX developer/replenisher*, Sigma) entwickelt, kurz in Wasser gewaschen und anschließend in Fixiermedium fixiert (*GBX fixer/replenisher*, Sigma). Nach einem abschließenden Waschschrift in Wasser wurde der Film getrocknet.

3.3.7 Verwendete Lösungen für den Western Blot

A) Lysepuffer

Der Puffer zur Lyse der Oozyten wurde in doppelt destilliertem H₂O (ddH₂O) angesetzt und konnte für bis zu zwei Wochen im Kühlschrank (4 °C) gelagert werden.

Tab. 14: Zusammensetzung des Lysepuffers

Substanz	[mM]
HEPES	10
NaCl	83
MgCl ₂	1
+ 1% Triton X-100	

Der pH wurde mit 1 M HCl, bzw. 1 M NaOH auf 7,9 eingestellt.

HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure;

NaCl: Natriumchlorid,

MgCl₂: Magnesiumchlorid

B) SDS-Running Buffer

Vom *SDS-Running Buffer* wurde nach dem in Tab. 15 gelisteten Rezept 1 l einer 10fach konzentrierten Stammlösung hergestellt. Unmittelbar vor jeder SDS-PAGE wurde der *SDS-Running Buffer* aus dieser Stammlösung frisch angesetzt, indem 100 ml der 10fach konzentrierten Stammlösung mit entmineralisiertem (VE)-H₂O auf 1 l aufgefüllt wurde.

Tab. 15: Zusammensetzung des 10x *SDS-Running Buffers*

Substanz	Menge/1l
Glycin	144 g
TRIZMA Base	30,2 g
10 % SDS	100 ml

SDS: Natriumdodecylsulfat

C) Blotting Buffer

Die Zusammensetzung für 1 l einer 10fach konzentrierten Stammlösung des *Blotting Buffers* ist in Tab. 16 angegeben. Für den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde aus dieser Stammlösung der eigentliche *Blotting Buffer* frisch angesetzt. Dazu wurden 700 ml VE-H₂O mit 200 ml Methanol und 100 ml der Stammlösung vermischt.

Tab. 16: Zusammensetzung des 10x Blotting Buffers

Substanz	Menge/1l
Glycin	144 g
TRIZMA Base	30,2 g

D) Tris-buffered saline with Tween (TBST)

Als Grundlage für die Behandlung der Nitrocellulose-Membran beim Blocken und Waschen, sowie für die Antikörper-Inkubation wurde TBST (*Tris-buffered saline with Tween*) verwendet. Hierfür wurde zunächst eine 10fach konzentrierte Stammlösung hergestellt (vgl. Tab. 17), deren pH-Wert auf 7,6 eingestellt wurde. Aus dieser Stammlösung wurden 100 ml entnommen, mit VE-H₂O auf 1 l aufgefüllt und der pH auf 7,6 eingestellt. Durch Hinzufügen von 1 ml Tween-20 (Sigma) entstand das gebrauchsfertige TBST.

Tab. 17: Zusammensetzung des 10x TBS

Substanz	Menge/1l
NaCl	88 g
TRIZ-HCl	24 g
TRIZMA Base	5,6 g

Der pH wurde mit 1 M HCl, bzw. 1 M Tris auf 7,6 eingestellt.

E) Enhanced chemoluminescence (ECL) - Substrat-Lösung

Als Substrat für die Peroxidase diente eine selbst hergestellte Substrat-Lösung. Diese bestand aus 3 verschiedenen Komponenten: Lösung A und B, sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2):

Lösung A**Tab. 18: Zusammensetzung der ECL-Lsg A**

Substanz	Menge
0,1 M TRIS-HCl, pH 8,6	200 ml
Luminol	50 mg
Im Kühlschrank lagern	

Lösung B**Tab. 19: Zusammensetzung der ECL-Lsg B**

Substanz	Menge
DMSO	10 ml
Para-Hydroxycoumarinsäure	11 mg
Bei Raumtemperatur im Dunkeln lagern	

DMSO: Dimethylsufoxid

Die Herstellung des fertigen ECL-Substrates erfolgte durch Vermischen von 4 ml Lösung A mit 400 μ l der Lösung B, sowie anschließender Zugabe von 1,2 μ l 30 %igem H_2O_2 . Das ECL-Substrat wurde stets unmittelbar vor der Entwicklung des Filmes frisch angesetzt, durch Schütteln gemischt und bis zur Verwendung im Dunkeln gelagert.

4 Elektrophysiologie

4.1 Das Prinzip der Spannungsklemme

Alle elektrophysiologischen Messungen der vorliegenden Dissertation wurden mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (*Two-Electrode-Voltage-Clamp*; TEVC), oder der *Patch Clamp* Technik durchgeführt. Beide Techniken basieren auf dem Messprinzip der Spannungsklemme (*Voltage-Clamp*), welches im Folgenden genauer erläutert werden soll.

Das Membranpotential einer Zelle resultiert aus der ungleichen Verteilung von Ionen im intra- und extrazellulären Raum, sowie der selektiven Permeabilität der Zellmembran für die einzelnen Ionenarten (Penzlin 2005). Kommt es zu einer Verschiebung von Ladungen über die Membran, entstehen Ionenströme. Um diese Ionenströme messen zu können, wurde von Cole und Curtis im Jahr 1940 die Spannungsklemme entwickelt (Curtis und Cole 1940), welche später von Hodgkin und Huxley optimiert wurde (Hodgkin *et al.* 1952). Dies geschah zunächst in dem Bestreben, elektrisch erregbare Membranen zu charakterisieren (Curtis und Cole 1940; Hodgkin *et al.* 1952), hat sich jedoch schnell auch zu einer gebräuchlichen Methode entwickelt, um Ströme von in *Xenopus*-Oozyten exprimierten Ionenkanälen zu messen (Wagner *et al.* 2000).

Die Spannungsklemme basiert auf der Methode der elektrischen Rückkopplung, mit deren Hilfe das Membranpotential („Istwert“, U_{Ist}) einer Zelle gemessen und auf einen definierten Wert „geklemmt“ werden kann. Hierfür wird U_{Ist} kontinuierlich mit einem vorgegebenen Klemmpotenzial („Sollwert“, U_{Soll}) abgeglichen. Kommt es aufgrund von Ladungsverschiebungen über die Membran zu einer Abweichung zwischen U_{Ist} und U_{Soll} , so wird ein kompensatorischer Strom (I_{Komp}) generiert und in die Zelle appliziert, durch welchen U_{Ist} und U_{Soll} wieder aneinander angeglichen werden.

Dabei entspricht der Kompensationsstrom exakt dem Strom, welcher durch den Iontentransport über die Membran der untersuchten Zelle hervorgerufen wird. Kommt es zur Aktivierung oder Inhibierung von in der Oozyte exprimierten Ionenkanälen, so wirkt sich dies entsprechend unmittelbar auf den Ionenstrom aus und kann durch die Änderung des applizierten Stromes quantifiziert werden.

4.2 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

4.2.1 Aufbau der verwendeten Messapparatur

Eine schematische Darstellung der verwendeten Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ist in Abb. 17 dargestellt.

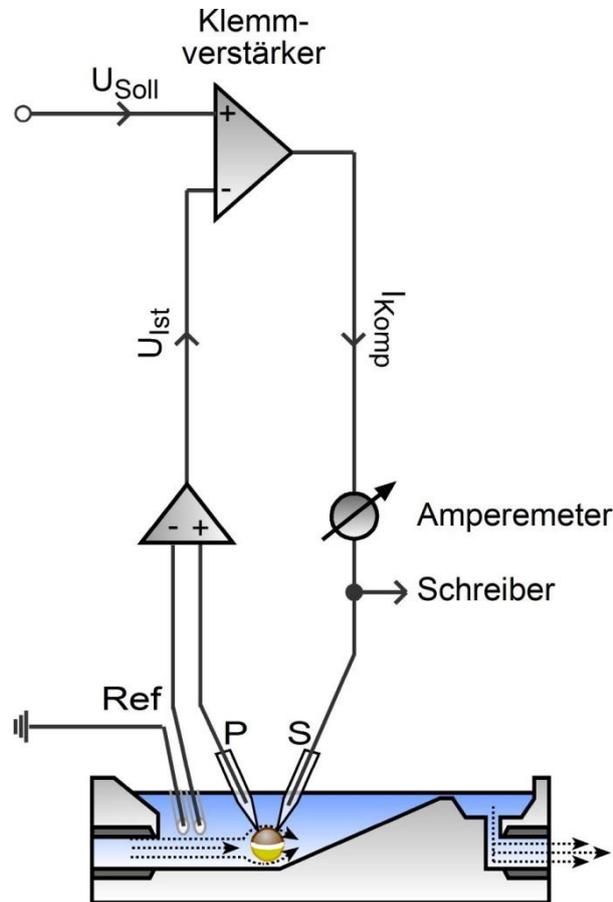


Abb. 17: Schematischer Aufbau der verwendeten Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Mittels der Potentialelektrode (P) wird das Membranpotential der Zelle (U_{Ist}) gemessen und an den Klemmverstärker weitergeleitet. Dort wird dieser Istwert mit der vorgegebenen Klemmspannung (U_{Soll}) verglichen. Bei Abweichungen zwischen U_{Ist} und U_{Soll} wird ein Kompensationsstrom (I_{Komp}) generiert und über die Stromelektrode in die Zelle appliziert. Dieser fließt so lange, bis U_{Ist} und U_{Soll} aneinander angeglichen sind. Badelektroden dienen als Referenz (Ref).

Bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme wurde zunächst mit Hilfe einer intrazellulären Potentialelektrode (P) das Membranpotential (U_{Ist}) der Oozyte gemessen, wobei eine in die Badlösung eingetauchte Elektrode als Referenz diente (Ref). Dieser „Istwert“ wurde an einen Klemmverstärker (*Turbo TEC-03x*, npi) weitergeleitet, der diesen mit dem vorgegebenen „Sollwert“ (U_{Soll}) von -60 mV verglich und den benötigten kompensatorischen Klemmstrom (I_{Komp}) generierte. Dieser wurde über die intrazelluläre Stromelektrode (S) in die Zelle appliziert, um das Potential auf dem benötigten konstanten Wert von -60 mV zu halten. Die jeweiligen Referenzelektroden lagen als Badelektroden in der die Zelle umspülenden Lösung

vor. Bei ihnen handelte es sich um Kupferdrähte, an deren Ende ein in die Lösung ragender Silberdraht angelötet war. Dieser wurde vor Beginn der Messungen chloriert, indem die Silberdrähte bei einer Spannung von ca. 1 V in eine 0,1 M HCl-Lösung eingetaucht wurden.

Der generierte Kompensationsstrom wurde an einem Amperemeter abgelesen und über einen Schreiber (Kipp&Zonen) aufgezeichnet. Messkammer und Mikromanipulatoren befanden sich auf einem Druckluft-gedämpften Tisch, um die empfindlichen Messungen – besonders im nA-Bereich – vor Vibrationen und mechanischen Störungen zu schützen. Um ein Einwirken von elektromagnetischen Streuungen zu verhindern, war die gesamte Messapparatur von einem Farady-Käfig umgeben. Zusätzlich wurden alle verwendeten Geräte geerdet.

4.2.2 Herstellung Mikroelektroden

Als intrazelluläre Mikroelektroden (Potential-und Stromelektroden) dienten chlorierte Silberdrähte, die in eine mit 1 M KCl befüllte Glaskapillare eingesteckt wurden. Die Borosilikat-Glaskapillaren (Hilgenberg), die einen Innendurchmesser von 0,7 mm und einen Außendurchmesser von 1,2 mm aufwiesen, wurden mit Hilfe eines horizontalen Pullers (*DMZ Universal Puller*, Zeitz) in zwei Hälften ausgezogen, so dass ein Spitzendurchmesser von weniger als 1 μm entstand. Die so erzeugten Glaskapillaren wurden luftblasenfrei mit einer Elektrolytlösung (1 M KCl) befüllt, auf den chlorierten Silberdraht gesteckt und im Elektrodenhalter arretiert. Anschließend wurden die Spitzen beider Kapillaren in die Badlösung eingetaucht. Vor Beginn der Messung wurde das Eigenpotential der Elektroden auf 0 mV abgeglichen und deren Widerstand bestimmt. Es wurden ausschließlich Elektroden verwendet, deren Widerstand zwischen 1 und 5 M Ω lag.

Als Referenzelektroden dienten chlorierte Silberdrähte, welche an einen Kupferdraht angelötet wurden. Diese wurden über seitliche Öffnungen in die Messkammer eingebracht (siehe Abb. 18A).

4.2.3 Die Messkammer

Die verwendete Messkammer bestand aus Plexiglas und war im Rahmen der Dissertation eigens für die Applikation von Scherkraft auf Oozyten entworfen und angefertigt worden. Sie bestand aus einem Lösungszufluss, einer schmalen Rinne, in welche die Oozyte eingebracht wurde, sowie einem Lösungsabfluss. Seitliche Bohrungen erlaubten das Einbringen der Referenzelektroden (vgl. Abb. 18).

Die Messkammer war durch Volumenstrombegrenzer (*Präzisionsfestdrossel R-003-6*, Aircom) mit einem Perfusionssystem verbunden (*ALA-VM4*, ALA Scientific), welches wiederum über

einen Druckregler (*ALA PR-10*, ALA Scientific) an das zentrale Druckluftsystem des Gebäudes angeschlossen war. Mittels des Druckreglers konnte über die gezielte Regulation des Drucks die Fließgeschwindigkeit der Perfusionslösung präzise eingestellt werden.

Die Oozyte wurde direkt vor dem Lösungszufluss platziert (vgl. Abb. 18). So konnten *via* Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit exakt dosierte Scherkräfte auf die Oozyte und damit den ENaC appliziert werden.

Der Lösungsabfluss war mit einer Vakuumpumpe verbunden. Diese saugte überflüssige Perfusionslösung ab und sorgte auf diese Weise sowohl für einen kontinuierlichen Lösungswechsel, als auch für einen konstanten Flüssigkeitspegel innerhalb der Messkammer.

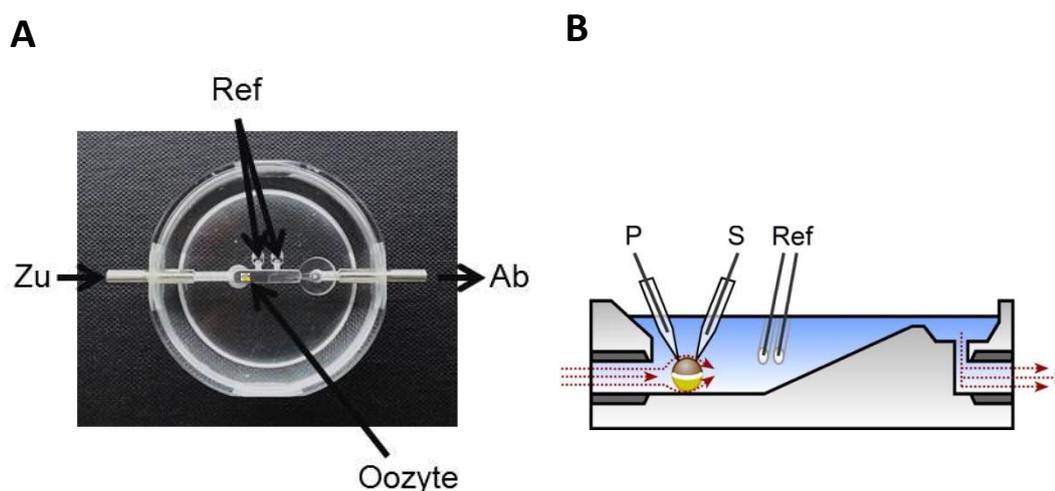


Abb. 18: Aufbau der Messkammer zur Applikation von Scherkraft auf Oozyten

A Über den Lösungszufluss (Zu) wurde die zu applizierende Lösung in die Kammer geleitet, welche mit Hilfe einer Vakuumpumpe über den Lösungsabfluss (Ab) wieder entfernt wurde. Auf diese Weise fand ein kontinuierlicher Lösungswechsel im Inneren der Kammer statt. Über seitliche Öffnungen wurden die Badelektroden, welche als Referenzen für die intrazellulären Mikroelektroden dienen, in die Kammer eingeführt (Ref). Die zu messende Oozyte wurde direkt vor dem Lösungszufluss platziert. Auf diese Weise konnte gezielt Scherkraft auf die Oozyte appliziert werden, indem die Perfusionsgeschwindigkeit erhöht wurde. **B** Schematische Darstellung der Messkammer. Die roten Pfeile symbolisieren den Flüssigkeitsstrom.

Für die Zuleitung der Perfusionslösung wurden ausschließlich Silikonschläuche mit einem Innendurchmesser von 1 mm verwendet. Dies ermöglichte in Kombination mit der Schmalheit der Messkammer auch bei niedrigen Perfusionsgeschwindigkeiten ein rasches und effizientes Wechseln der Badlösung.

4.2.4 Berechnung von Scherkräften

Im Folgenden soll die Größe der auf die Oozyte applizierten Scherkraft beispielhaft für eine Perfusionsgeschwindigkeit von 2,5 ml/min quantifiziert werden. Hierzu wurde zunächst die mittlere Strömungsgeschwindigkeit der Perfusionslösung ω ermittelt. Diese ergibt sich aus dem Volumenstrom V und dem Querschnitt des durchströmten Lösungszuflusses A und wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\omega = \frac{V}{A}$$

Gleichung 1: Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit

ω : mittlere Strömungsgeschwindigkeit der Perfusionslösung (in cm/s)

V : Volumenstrom (in cm³/sec)

A : Querschnitt des Lösungszuflusses (in cm²)

Bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 2,5 ml/min und einem Durchmesser des Lösungszuflusses von 2 mm ergab sich demnach eine mittlere Strömungsgeschwindigkeit von 1,3 cm/sec.

Mit Hilfe der mittleren Strömungsgeschwindigkeit wurde im Anschluss die sog. Reynolds-Zahl (R_e) berechnet (siehe Gleichung 2). Diese gibt an, ob es sich um eine laminare oder turbulente Strömung handelt. Sie berechnet sich aus der mittleren Strömungsgeschwindigkeit ω , der Dichte der Perfusionslösung ρ , dem Durchmesser des Lösungszuflusses D und der Viskosität der Perfusionslösung λ :

$$R_e = \frac{\rho \omega D}{\lambda}$$

Gleichung 2: Berechnung der Reynolds-Zahl

R_e : Reynolds-Zahl

ρ : Dichte (in g/cm³) von Wasser bei 20 °C = 1 g/cm³

D : Durchmesser des Lösungszuflusses (in cm)

λ : Viskosität von Wasser bei 20 °C = 0,01 g/cm*s

Unter den gegebenen Parametern ergab sich eine Reynolds-Zahl von ~ 26 . Als laminar werden Strömungen betrachtet, bei denen die Reynolds-Zahl zwischen 14 und 80 liegt (Mcnaughton und Sinclair 1966; Hoger *et al.* 2002). Aus diesem Grund konnte für die anschließenden Berechnungen von einer laminaren Strömung ausgegangen werden.

Daraufhin wurde die auftretende Zugkraft F_{Zug} ermittelt, welche sich zusätzlich zur mittleren Strömungsgeschwindigkeit ω , aus der Dichte des Mediums ρ , der Querschnittsfläche der Oozyte A und einem Zugkraftkoeffizient C_{Zug} zusammensetzt (vgl. Gleichung 3). Dieser

Zugkraftkoeffizient richtet sich nach der Form des umspülten Objektes und beträgt bei kugelförmigen Objekten, wie der Oozyte, 1 (Hoger *et al.* 2002).

$$F_{Zug} = 0,5\rho A\omega C_{Zug}$$

Gleichung 3: Formel zur Bestimmung des Zugkraftkoeffizienten

F_{Zug} : Zugkraft (in dyn)

ρ : Dichte (in g/cm³) von Wasser bei 20 °C = 1 g/cm³

A : Querschnittsfläche (in cm²) der Oozyte (bei einem Durchmesser von 1 mm \cong 0,008 cm²)

ω : mittlere Strömungsgeschwindigkeit (in cm/sec)

C_{Zug} : Zugkraftkoeffizient (dimensionslos) = 1

Basierend auf dieser Gleichung ergab sich eine auf die Oozyte einwirkende Zugkraft von 0,001 dyn. Diese Zugkraft wurde in einem abschließenden Schritt mit der umströmten Oberfläche O der Oozyte ins Verhältnis gesetzt, um die einwirkenden Scherkräfte F_{Scher} zu bestimmen:

$$F_{Scher} = \frac{F_{Zug}}{O}$$

Gleichung 4: Berechnung der Scherkraft

F_{Scher} : Scherkraftkraft (in dyn/cm²)

F_{Zug} : Zugkraft (in dyn)

O : Oberfläche (in cm²) der Oozyte (bei einem Durchmesser von 1 mm \cong 0,03 cm²)

Auf diese Weise ergab sich bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 2,5 ml/min eine auf die Oozyte einwirkende Scherkraft von 0,2 dyn/cm².

4.2.5 Berechnung des Scherkraft-Effekts (SK-Effekt)

Zur Quantifizierung des SK-vermittelten Stromanstieges wurde jeweils der prozentuale Anstieg des Stromes – stets bezogen auf den Wert vor SK-Applikation – bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$SK\text{-Effekt (\%)} = \left(\frac{\Delta I_{ENaC} (+SK)}{\Delta I_{ENaC} (-SK)} * 100 \right) - 100$$

Gleichung 5: Formel zur Bestimmung des prozentualen Stromanstieges in Reaktion auf Scherkraft (SK-Effekt)

$\Delta I_{ENaC} (+SK)$: maximal durch Scherkraft induzierter, ENaC-vermittelter Strom

$\Delta I_{ENaC} (-SK)$: ENaC-vermittelter Strom unmittelbar vor Scherkraft-Applikation

4.2.6 Lösungen für TEVC-Messungen

Sämtliche Chemikalien für die TEVC-Messungen wurden in Oozyten-Ringerlösung (ORi) angesetzt. Dessen Zusammensetzung ist in Tab. 20 angegeben.

Tab. 20: Zusammensetzung der Ringerlösung für Oozyten (ORi)

Substanz	[mM]
NaCl	90
KCl	1
CaCl ₂	2
HEPES	5

NaCl: Natriumchlorid,
KCl: Kaliumchlorid,
CaCl₂: Calciumchlorid,
HEPES: N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfon-säure)
 Der pH-Wert der Ringerlösung wurde mittels Titration mit 1 M Natronlauge (NaOH), bzw. 1 M Salzsäure (HCl) auf pH 7,4 eingestellt.

4.2.7 Vorzeichenkonvention

Per Definition handelt es sich sowohl beim Einstrom positiver Ladungen (Kationen) in eine Zelle hinein, als auch beim Ausstrom negativer Ladungen (Anionen) aus der Zelle hinaus um negative Ströme, welche in Abbildungen als Auslenkung nach unten dargestellt werden. Konform hierzu gelten der Einstrom von Anionen, bzw. der Ausstrom von Kationen als positive Ströme und werden analog dazu als Auslenkung nach oben dargestellt.

4.2.8 Statistik

Alle Messwerte werden als Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean*) dargestellt. Die Signifikanz gleicher Stichproben wurde mit Hilfe des gepaarten, bzw. bei Vergleich von zwei unterschiedlichen Stichproben mit Hilfe des ungepaarten t-Tests nach Student durchgeführt. Bei Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Messreihen wurde die Signifikanz durch Anwendung einer univariaten Varianzanalyse (*Analysis of Variance*, ANOVA) ermittelt. Sowohl bei Anwendung des t-tests, als auch bei der ANOVA wurde jeweils zwischen den Signifikanzniveaus $p \leq 0,05$ (*) und $p \leq 0,01$ (**) unterschieden. Die Anzahl der durchgeführten Versuche wurde mit n, die Anzahl der verwendeten Donoren mit N kenntlich gemacht.

4.3 Die *Patch Clamp*-Technik

Bei der *Patch Clamp*-Technik handelt es sich um ein erstmalig im Jahr 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann beschriebenes Verfahren zur Messung von Strömen durch einzelne Ionenkanäle (Neher und Sakmann 1976). Mit Hilfe dieser Technik war es erstmalig möglich, das Schaltverhalten einzelner Membranproteine, bzw. Ionenkanäle, in Echtzeit zu untersuchen. Das Messprinzip basiert ebenfalls auf dem Prinzip der Spannungsklemme. Die Messelektrode wird jedoch im Unterschied zur Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) nicht in die Zelle eingestochen, sondern lediglich unter Bildung eines hohen Abdichtwiderstandes, des sog. *Giga-Seals* (*seal*, engl. für: Abdichtung), auf die Zelle aufgesetzt. Der unter der Messelektrode liegende Membranfleck (*Patch*; engl. für: Fleck, Stelle) wird anschließend auf ein vorgegebenes Potential „geklemmt“, so dass der Ionenstrom durch die im Membranfleck vorhandenen Ionenkanäle gemessen werden kann. Die Messelektrode dient dabei zugleich zur Vorgabe des Klemmpotentials, als auch zur Messung der durch den Kanal fließenden Ionenströme, so dass bei dieser Technik im Vergleich zur Zwei-Elektroden-Spannungsklemme nur eine Elektrode vonnöten ist (siehe Abb. 19).

4.3.1 Das Messprinzip der *Patch Clamp*-Technik

Durch das Aufsetzen einer aus Glas gefertigten Messelektrode (*Patch*-Pipette) auf die Zelle wird ein kleiner Membranfleck unterhalb der Elektrode elektrisch von seiner Umgebung isoliert. Dies geschieht durch die Bildung eines sog. *Gigaseals* und bedeutet, dass die Abdichtwiderstände zwischen Membran und Glaspipette im Gigaohm (GΩ)-Bereich liegen sollten. Durch die Ausbildung eines solchen *Gigaseals* werden Leckströme zwischen Membran und Messelektrode – die zu einem störenden Hintergrundrauschen führen – auf ein Minimum reduziert. Die Reduzierung dieser Leckströme unter Bildung eines *Gigaseals* ist die Grundvoraussetzung für die Messung von Einzelkanalereignissen, da die Stromamplitude eines isolierten Ionenkanals im Bereich weniger picoampere (pA) liegt (z.B. 0,5 pA für den ENaC).

Nach Ausbildung eines *Gigaseals* wird das Membranpotential des *Patches* gemessen, wobei eine in die Badlösung eingetauchte Elektrode als Referenz dient. Dieser Istwert (U_{Ist}) wird in der sog. *Headstage* (dem Vorverstärker) amplifiziert und an den eigentlichen *Patch-Clamp* Verstärker weitergeleitet. Dieser vergleicht den Istwert mit dem vorgegebenen Sollwert (U_{Soll}). Differenzen zwischen U_{Ist} und U_{Soll} können sowohl dadurch entstehen, dass die vorgegebene Klemmspannung durch den Experimentator verändert wird, oder aber durch Änderungen der Leitfähigkeit der Membran, bedingt z.B. durch das Öffnen/Schließen eines oder mehrerer Ionenkanäle. Bei Abweichungen zwischen U_{Ist} und U_{Soll} generiert der *Patch-Clamp* Verstärker

einen kompensatorischen Klemmstrom (I_{Komp}), welcher über die Messelektrode wieder auf den Patch appliziert wird. Der Kompensatorische Klemmstrom ist dabei genauso groß wie der über die Zellmembran fließende Strom, diesem jedoch entgegengesetzt. Er fließt so lange, bis die Differenz zwischen U_{Ist} und U_{Soll} ausgeglichen ist und kann mit Hilfe eines speziellen Messprogramms zur späteren Auswertung digital aufgezeichnet werden.

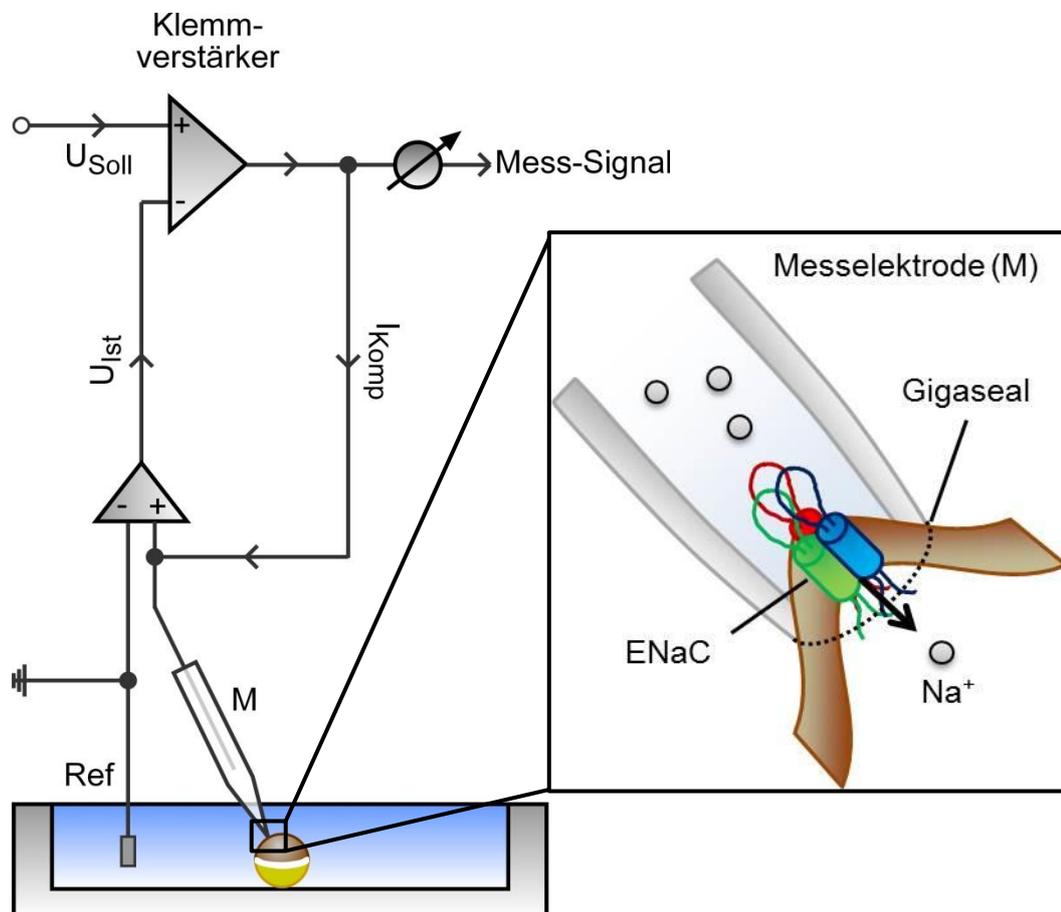


Abb. 19: Das Messprinzip der Patch Clamp Technik

Durch Aufsetzen der Messelektrode (M) auf die Membran der Oozyte wird ein kleiner Membranfleck (*Patch*) unter Bildung eines hohen Abdichtwiderstandes (*Gigaseal*) elektrisch von seiner Umgebung isoliert. Das Membranpotential des *Patches* (Istwert, U_{Ist}) wird durch Vergleich mit einer Referenzelektrode (Ref) ermittelt und an den Klemmverstärker weitergeleitet. Kommt es auf Grund einer Diffusion von Na^+ -Ionen durch den in der Membran exprimierten ENaC zu Ladungsverschiebungen, werden der Istwert (U_{Ist}) und die vorgegebene Klemmspannung (Sollwert, U_{Soll}) durch die Generierung eines Kompensationsstromes (I_{Komp}) aneinander angeglichen. I_{Komp} entspricht hierbei dem durch den isolierten Ionenkanal fließenden Strom und kann als Mess-Signal detektiert und aufgezeichnet werden.

In Abhängigkeit davon, ob der *Patch* zur Messung in der intakten Zelle belassen oder aber aus ihr herausgelöst wird, spricht man von verschiedenen *Patch*-Konfigurationen, welche im Folgenden im Detail erläutert werden sollen.

4.3.2 Patch-Konfigurationen

Wird die Messelektrode unter Bildung eines *Gigaseals* auf die Zell-Oberfläche aufgesetzt, befindet man sich in der *Cell-attached* Konfiguration (siehe Abb. 20). In diesem Modus können die Ströme durch die im isolierten *Patch* vorliegenden Ionenkanäle gemessen werden. Sie dient zudem als Ausgangssituation, um in die anderen *Patch*-Konfigurationen zu gelangen.

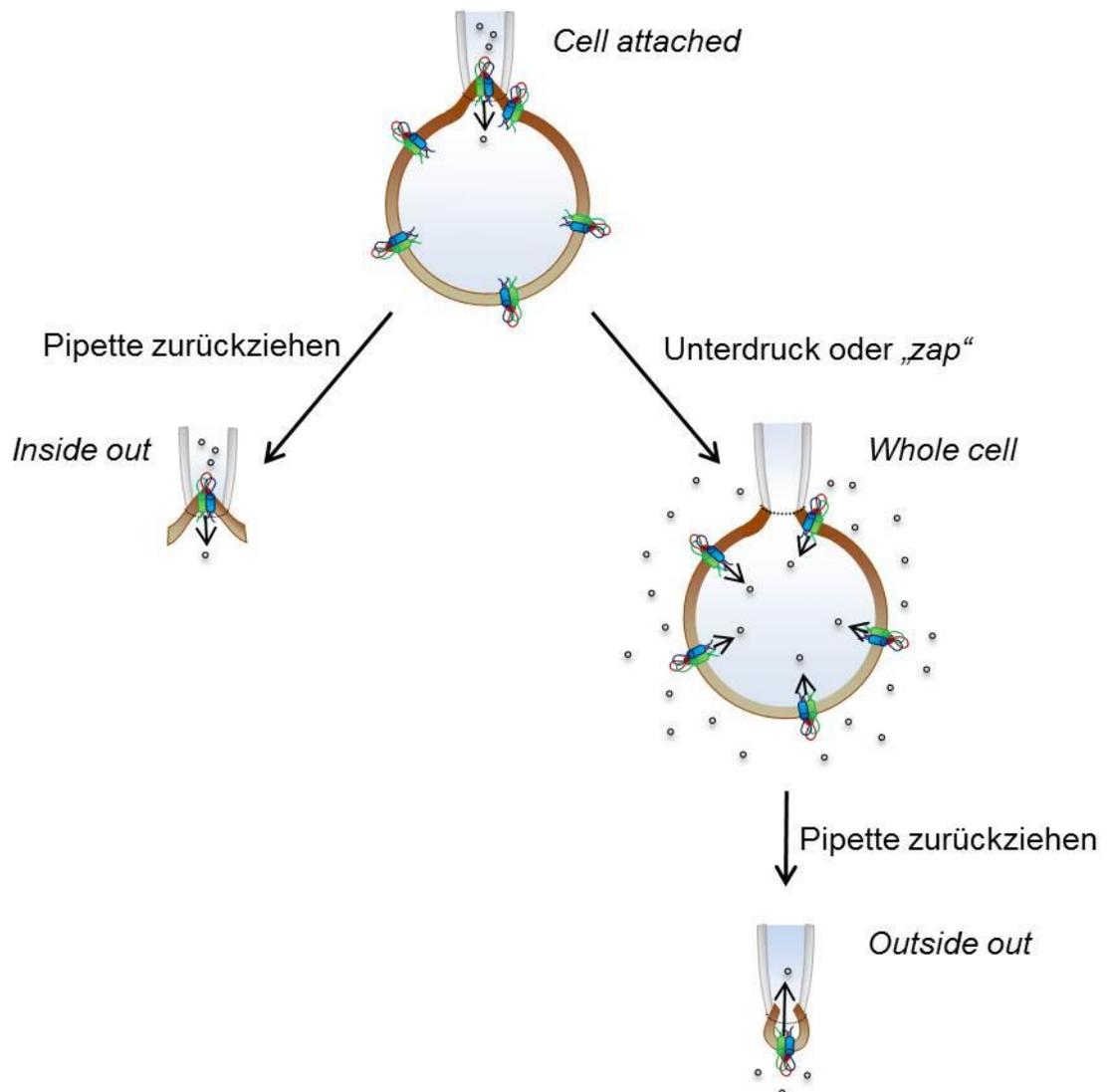


Abb. 20: Patch-Konfigurationen

Durch Aufsetzen der *Patch*-Pipette gelangt man in die *Cell attached*-Konfiguration. Durch ein Zurückziehen der Pipette wird der *Patch* aus der Membran derart herausgelöst, dass die Innenseite der Membran der Badlösung zugewandt ist (*Inside out*). Durch Anlegen eines Unterdrucks oder „zappings“ - ausgehend von der *Cell attached* Konfiguration - wird der *Patch* zerstört, so dass die Summe aller über die Membran fließender Ströme gemessen werden kann (*Whole cell*). Wird die Pipette aus dieser Konfiguration zurückgezogen, schließt sich die Membran über der Pipette, so dass die Außenseite der Membran der Badlösung zugewandt ist (*Outside out*).

Durch das Zurückziehen der *Patch*-Pipette wird der Membranfleck unter der Messelektrode aus der Zelle herausgelöst, ohne dass das *Gigaseal* zerstört wird. Da sich das Innere der Zelle

nun der Badlösung zugewandt befindet, spricht man von der *Inside out*-Konfiguration (vgl. Abb. 20). In dieser Konfiguration können Substanzen von der intrazellulären Seite auf die Kanäle appliziert werden, um z.B. Faktoren von Signaltransduktions-Kaskaden zu untersuchen.

Wird der *Patch* ausgehend von der *Cell attached*-Konfiguration durch einen kurzen elektrischen Impuls („zap“) oder das Anlegen eines Unterdrucks zerstört, gelangt man in die *Whole cell*-Konfiguration (vgl. Abb. 20). In diesem Modus wird die Summe aller über die Membran fließenden Ströme gemessen. Eine Auflösung einzelner Kanäle ist in dieser Konfiguration nicht möglich.

Zieht man die *Patch*-Pipette aus der *Whole cell*-Konfiguration langsam zurück, schließt sich die Membran so über die Öffnung der Pipette, dass nun das Äußere der Membran der Badlösung zugewandt ist (*Outside out*, siehe Abb. 20). In dieser Konfiguration kann das Schaltverhalten von Einzelkanälen im Detail charakterisiert werden, indem z.B. Inhibitoren oder Aktivatoren in die Badlösung appliziert werden. Sämtliche Messungen der vorliegenden Dissertation wurden in der *Cell attached*-Konfiguration durchgeführt.

4.3.3 Der Messaufbau

Da es sich bei der *Patch Clamp* Technik um eine äußerst störanfällige Art der Messung handelt, müssen bestimmte Anforderungen an den Messplatz erfüllt sein. So war der Messaufbau auf einem schwingungsgedämpften Labortisch aufgebaut, um mechanische Schwingungen abzufangen. Der gesamte Versuchsaufbau war zudem von einem Farady'schen Käfig umgeben, um die Messung gegen elektromagnetische Strahlungen abzuschirmen. Desweiteren waren sämtliche Komponenten des Messstandes geerdet.

4.3.4 Herstellung der Messelektroden

Als *Patch*-Pipette diente ein in einem Elektrodenhalter befestigter chlorierter Silberdraht, auf welchen eine Borosilikat-Glaskapillare (Aussendurchmesser 1,6 mm, Wandstärke 0,16 mm, mit Filament, Hilgenberg) aufgesteckt wurde. Diese Kapillare wurde zunächst unter Einwirkung von Hitze mittels eines Horizontalpullers (*DMZ Universal Puller*, Zeitz) ausgezogen. Durch anschließendes „Feuerpolieren“, d.h. Anschmelzen der Spitze, wurden die Ränder geglättet. Auf diese Weise wurde die Kontaktfläche zur Zelle geebnet, um die Ausbildung eines *Gigaseals* zu begünstigen.

Die so ausgezogene Kapillare wurde luftblasenfrei mit extrazellulär-analoger Lösung befüllt (siehe Tab. 22) und so auf den chlorierten Silberdraht aufgesteckt, dass dieser in die Lösung

hineinragte. Anschließend wurde die Kapillare im Elektrodenhalter arretiert. Über den Elektrodenhalter konnte zusätzlich entweder Unter- oder Überdruck auf die Kapillare und damit auch auf die zu untersuchende Zelle appliziert werden. Die gesamte Messelektrode wurde anschließend an der *Headstage*, dem sog. Vorverstärker, befestigt. Die *Headstage* konnte über eine Verbindung zu Mikromanipulatoren manövriert und damit an die Zelle heran gefahren werden.

Als Badelektrode diente ein chlorierter Silberdraht der an einen Kupferdraht angelötet wurde. Der Silberdraht wurde in einer mit 3%igem Agar gefüllten Pipettenspitze (Agarbrücke) befestigt. Die Agarbrücke wurde hergestellt, indem 0,3 g Agar (Sigma) in 10 ml einer 0,1 M KCl-Lösung aufgeköcht wurden, bis der Agar vollständig gelöst war. Anschließend wurden 0,6 μ l dieser Agarlösung luftblasenfrei in Pipettenspitzen aufgezogen. Dies musste rasch geschehen, um einem Aushärten der Agarlösung zuvor zu kommen. Die so aufgezogenen Pipettenspitzen wurden zum Aushärten kurz trocknen lassen und anschließend bis zum weiteren Gebrauch in 0,1 M KCl im Kühlschrank gelagert.

Um die Badelektrode herzustellen, wurde die Agarbrücke mit 0,1 M KCl überschichtet und der chlorierte Silberdraht so in die Elektrolytlösung gesteckt, dass die Spitze nicht mit dem Agar in Kontakt kam. Die Badelektrode wurde mit der Spitze in die Badlösung eingetaucht und mit dem Vorverstärker (*Headstage*) verbunden.

4.3.5 Versuchsablauf

Vor jeder Messung wurde die Vitellinhülle der Oocyte entfernt (vgl. Abschnitt 2.3.1), da ansonsten ein Aufsetzen der *Patch*-Pipette auf die Membran und damit das Ausbilden eines *Gigaseals* nicht möglich wäre. Nach der Devitellinisierung wurde die Oocyte zunächst in KulORi und anschließend in die mit sterilfiltrierter intrazellulär-analoger Lösung (siehe Tab. 22) gefüllte Messkammer überführt.

Die Badelektrode wurde so platziert, dass ihre Spitze in die Messkammer eintauchte und an den Vorverstärker angeschlossen. Anschließend wurde die Messelektrode wie in Abschnitt 4.3.4 hergestellt und nach Anlegen eines leichten Überdrucks in die Badlösung eingetaucht. Der Überdruck diente dem Zweck, die Spitze der Kapillare sauber zu halten und somit eine Anlagerung von Schmutzpartikeln zu verhindern. Außerdem verhinderte der angelegte Überdruck einen Einstrom der Badlösung in die Kapillare. Nach dem Eintauchen der *Patch*-Pipette wurde das *Offset*-Potential auf null abgeglichen, um die Genauigkeit der Messung zu gewährleisten. Nun wurde die *Patch*-Pipette unter optischer Kontrolle vorsichtig mit Hilfe der Mikromanipulatoren an die Zelle herangefahren und auf die Membran aufgesetzt. Durch

Anlegen eines Unterdrucks wurde die Membran in die Pipette hereingesaugt. Mittels der Applikation eines Testpulses über die Messsoftware *Clampex* (*Version 8.02.113*, AXON Instruments) konnte der Elektrodenwiderstand bestimmt werden, welcher bei Annäherung an die Membran anstieg und mehrere $G\Omega$ bei der Bildung eines *Gigaseals* erreichte.

Nach der Ausbildung eines *Gigaseals* wurde über die Software eine Klemmspannung von 100 mV vorgegeben, der resultierende verstärkte Kompensationsstrom (200 mV/pA) bei 100 Hz Tiefpass-gefiltert und mit 2 kHz aufgezeichnet. Auftretendes Störgeräusch konnte mittels des 50 Hz Phasen-Amplituden-Modulators reduziert werden.

4.3.6 Lösungen für *Patch Clamp*-Messungen

Für *Patch Clamp*-Messungen wurden sowohl eine intrazellulär-analoge, als auch eine extrazellulär-analoge Lösung hergestellt, die als Bad-, bzw. Pipettenlösung dienen (Tab. 21 und Tab. 22). Beide Lösungen wurden in ddH₂O angesetzt und unmittelbar vor Gebrauch steril filtriert (*MILLEXGP Filter Unit 0,22 μm* , Millipore Express).

Tab. 21: Zusammensetzung der extrazellulär-analogen Lösung

Substanz	(mM)
NaCl	90
CaCl ₂	2
KCl	1
HEPES	5

NaCl: Natriumchlorid,

CaCl₂: Calciumchlorid,

KCl: Kaliumchlorid,

HEPES: N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)

Der pH-Wert (7.4) wurde mittels Titration mit 1 M Natronlauge (NaOH), bzw. 1 M Salzsäure (HCl) auf pH 7,4 eingestellt.

Tab. 22: Zusammensetzung der intrazellulär-analogen Lösung

Substanz	(mM)
KCl	145
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	2
Glukose	5,5
HEPES	10

KCl: Kaliumchlorid,

CaCl₂: Calciumchlorid,

MgCl₂: Magnesiumchlorid

HEPES: N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)

Der pH-Wert (7.2) wurde mittels Titration mit 1 M Natronlauge (NaOH), bzw. 1 M Salzsäure (HCl) auf pH 7,2 eingestellt.

4.3.7 Auswertung der Messdaten

Für die Auswertung der erhobenen Messdaten wurden die Programme *Origin* (Version 9.0) und *Microsoft Excel* (Version 2010) genutzt, während die graphischen Abbildungen mit Hilfe des Programms *Macromedia Freehand* (Version MX) erstellt wurden.

Für die Bestimmung der **Permeabilität (P)** wurden in einem Spannungsbereich von +20 bis -100 mV die Kanalamplituden von mindestens drei Kanalereignissen ausgemessen und gegen die jeweilige Spannung aufgetragen. Unter Zuhilfenahme der *Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung* für Ionenströme konnte so die Permeabilität ermittelt werden:

$$\text{Bei } U_M \neq 0: I = PzF (C_i - C_e)$$

$$\text{Bei } U_M = 0: I = PzF\xi \left[\frac{C_i - C_e e^\xi}{1 - e^\xi} \right], \text{ wobei } \xi = \frac{zU_M F}{RT}$$

Gleichung 6: Formel zur Bestimmung der Permeabilität

U_M: Membranpotential

I: Strom

P: Permeabilität des Ions

z: Ladung des Ions

c_i/c_a: Ionenkonzentration innen, bzw. außen

R: Gaskonstante

T: Absolute Temperatur

F: Faraday-Konstante

Die **relative Offenwahrscheinlichkeit** (NP_o) der im *Patch* enthaltenen Kanäle wurde nach folgender Formel berechnet:

$$NP_o = \sum \frac{t_n n}{T}$$

Gleichung 7: Formel zur Berechnung der relativen Offenwahrscheinlichkeit

t: Verweildauer im jeweiligen Level

n: Level

T: Gesamtdauer der Messung

Die Bestimmung der **Offenwahrscheinlichkeit** (P_o) erfolgte nach folgender Gleichung:

$$P_o = \left(\sum_n^N n P_n \right) / N$$

Gleichung 8: Gleichung zur Bestimmung der Offenwahrscheinlichkeit

n: Level

N: Anzahl der aktiven Kanäle

P_n: durchschnittliche Ereigniswahrscheinlichkeit

Die Anzahl der Kanäle wird bei diesem Verfahren jedoch oft unterschätzt, da nicht immer alle Kanäle zeitgleich offen, bzw. geschlossen sind und sich demzufolge mehrere Kanalereignisse überlagern können. Aus diesem Grund wurde die experimentell ermittelte Ereigniswahrscheinlichkeit (P_n) mit theoretisch ermittelten P_n -Werten verglichen, welche basierend auf einer Binomialverteilung gewonnen wurden. Grundvoraussetzung für dieses Verfahren ist die Annahme, dass alle im *Patch* enthaltenen Kanäle identisch sind und unabhängig voneinander agieren. Die Offenwahrscheinlichkeit wurde lediglich bei denjenigen Messungen ausgewertet, bei denen die theoretische Verteilung der Ereigniswahrscheinlichkeiten (P_n) mit der gemessenen P_n maximal übereinstimmte. Detailliert beschrieben wurde dieses Verfahren von Anantharam *et al.* 2006 (Anantharam *et al.* 2006).

Die **mittlere Offen-Zeit** (t_o), bzw. **Geschlossen-Zeit** (t_c) der Kanäle wurde folgendermaßen bestimmt:

$$t_o = P_oNT / \sum E_n$$

$$t_c = (1 - P_oNT) / \sum E_n$$

Gleichung 9: Berechnung der mittleren Offen- bzw. Geschlossen-Zeit

P_o: Offenwahrscheinlichkeit

N: Anzahl der aktiven Kanäle (durch Binomialverteilung bestätigt)

T: Gesamtdauer der Messung

E: Anzahl der Ereignisse bei einem bestimmten Level (n)

n: Level

4.3.8 Vorzeichenkonvention

Per Konvention gilt ein Einstrom positiver Ladungen in die Zelle hinein als Einwärtsstrom (z.B. bei der *Cell Attached* Konfiguration von der Pipette in das Zytosol) und wird als Auslenkung nach unten dargestellt. Ein Ausstrom von Kationen gilt hingegen als Auswärtsstrom und wird graphisch als Auslenkung nach oben dargestellt. Für den Fluss negativer Ladungen gilt das Umgekehrte.

Die Verwendung einer intrazellulär-analogen (Hoch-K⁺-)Lösung als Badlösung diente im *Cell Attached* Modus der Depolarisation der Oozyten-Membran. Aufgrund dessen entsprach die vorgegebene Klemmspannung dem Membranpotential der Oozyte – jedoch mit umgekehrtem Vorzeichen.

5 Homologie-Modelling zur Vorhersage der 3D-Struktur des α - und δ 1ENaC

Das *Homologie-Modelling* stellt eine adäquate Möglichkeit zur Vorhersage der Tertiär- und Quartär-Struktur von Proteinen dar, welche bisher kristallographisch noch nicht dargestellt wurden. Dabei dient ein homologes Protein mit bereits bekannter Struktur als *template*, auf das die zu untersuchende Aminosäuresequenz übertragen wird. Auf diese Weise kann die theoretische räumliche Struktur des unbekanntes Proteins vorhergesagt werden (Zhang und Skolnick 2005; Kiefer *et al.* 2009; Biasini *et al.* 2014).

Zur detaillierten Lokalisation von Asparaginen innerhalb der Extrazellulären Domäne des α - und δ 1ENaC wurden daher in Zusammenarbeit mit Pawel Szczesniak (*Institut für Anatomie und Zellbiologie*) und Dr. Mike Althaus (*Institut für Tierphysiologie*, beide Justus-Liebig-Universität Gießen) mittels *Homologie-Modelling* theoretische Struktur-Modelle der beiden ENaC-Untereinheiten erstellt. Diese basierten auf der Aminosäuresequenz der humanen α - (*UniProt identifier identifier*: P37088-1) bzw. δ 1ENaC-Untereinheit (*UniProt identifier identifier*: P51172-1). Als *template* diente die von Jasti *et al.* im Jahre 2007 publizierte 3D-Struktur des zum ENaC homologen *Acid sensing ion channel 1A* (ASIC1A) des Huhns (Jasti *et al.* 2007). Mit Hilfe der Software SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) wurde so die theoretische 3D-Struktur der beiden ENaC-Untereinheiten, sowie ihre jeweilige Zusammenlagerung zu einem Homotrimer simuliert (Biasini *et al.* 2014). Das auf diese Weise simulierte Strukturmodell wurde anschließend als PDB-Datei (Protein Data Bank) in das Programm *PyMol Molecular Graphics system 3.1* (Schröder, Inc. New York, NY, USA) exportiert. Mit Hilfe dieses Programmes war es möglich, durch Rotation der Struktur verschiedene Ansichten (z.B. Seitenansicht oder Aufsicht) der simulierten ENaC-Modelle zu visualisieren. Des Weiteren konnten die entsprechenden Asparagine farblich markiert und beispielsweise als Kalotten-Modell akzentuiert werden. Nicht zuletzt wurden mit dieser Software sowohl die hypothetische Kristallstruktur (α -Helices, bzw. β -Faltblätter) des α - und δ 1ENaC, als auch die hypothetische *Connolly*-Oberflächenstruktur (Connolly 1983), d.h. die für Lösungsmittel zugängliche Oberfläche des ENaC, simuliert.

III Ergebnisse

1 Scherkräfte aktivieren den humanen ENaC

Um den Einfluss von Scherkraft (SK) auf die Aktivität des humanen epithelialen Na⁺-Kanals (ENaCs) zu charakterisieren, wurden sowohl die α -, als auch die beiden Isoformen der δ ENaC-Untereinheit ($\delta 1$ und $\delta 2$) jeweils in Kombination mit β und γ heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Für die TEVC-Messungen wurden die ENaC-exprimierenden Oozyten bei ausgeschalteter Perfusion in der mit Oozyten-Ringer (ORi) gefüllten Messkammer platziert und mittels der intrazellulären Mikroelektroden punktiert. Anschließend wurde – nach Erreichen eines stabilen Membranpotentials – eine vorgegebene Klemmspannung von -60 mV angelegt. Der daraufhin gemessene transmembrane Strom (I_M) äquilibrierte nach wenigen Minuten auf einem stabilen Plateau. Über das druckluftgesteuerte Perfusionssystem konnte nun SK auf die Zelle – und damit die exprimierten ENaCs – appliziert werden. Änderungen der Kanal-Aktivität in Reaktion auf SK konnten auf diese Weise unmittelbar charakterisiert und aufgezeichnet werden. Abschließend wurde bei jeder Messung der ENaC-Blocker Amilorid appliziert. Die Differenz zwischen den gemessenen Stromwerten (I_M) und dem unter Amilorid verbleibenden Reststrom (I_{Ami}) repräsentierte den ENaC-vermittelten, amiloridsensitiven Strom ($\Delta I_{ENaC} = I_M - I_{Ami}$).

1.1 Der Einfluss von SK auf den $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$

Der ΔI_{ENaC} $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ -exprimierender Oozyten äquilibrierte bei ausgeschalteter Perfusion (0 dyn/cm^2) auf einem Wert von $1,7 \pm 0,2 \mu\text{A}$ und stieg durch die Applikation von SK ($0,3 \text{ dyn/cm}^2$) auf durchschnittlich $7,5 \pm 0,7 \mu\text{A}$ an ($n = 52$; $N = 8$; $p \leq 0,01$; vgl. Abb. 21).

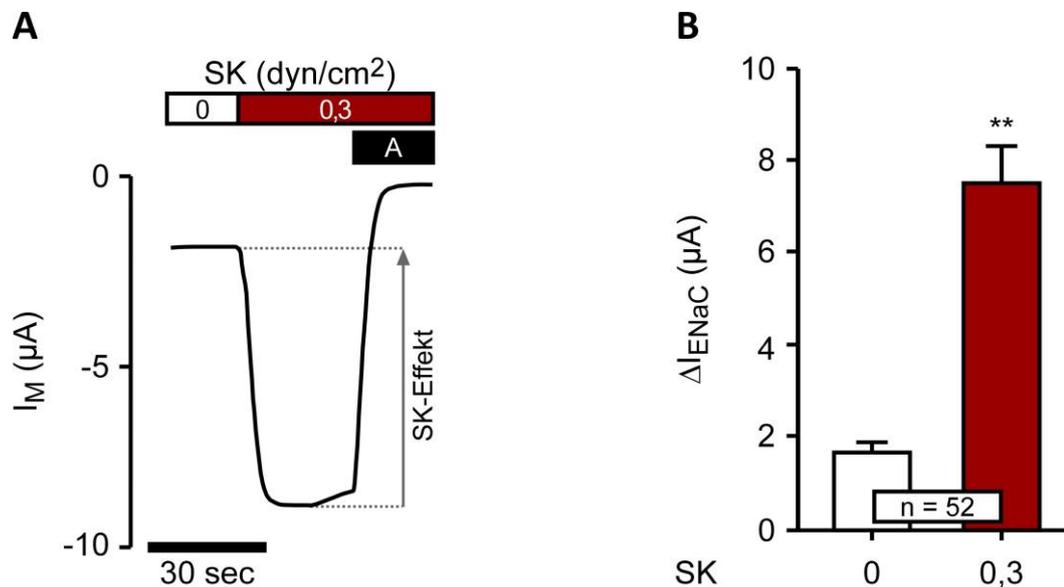


Abb. 21: Der Einfluss von Scherkraft (SK) auf den humanen $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$

A Repräsentative Stromspur einer $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ exprimierenden Oozyte, auf welche $0,3 \text{ dyn/cm}^2$ Scherkraft ($0,3$; roter Balken) appliziert wurde. Dies induzierte einen raschen Stromanstieg (SK-Effekt). Abschließende Applikation des ENaC-Blockers Amilorid (A, $10 \mu\text{M}$) diente der Bestimmung des ENaC-vermittelten Stromes. **B** Statistische Auswertung der in **A** gezeigten Experimente. Der ENaC-vermittelte Strom (ΔI_{ENaC}) war unter der Einwirkung von SK ($0,3$) signifikant höher als unter Kontrollbedingungen (0 , ohne SK). **: $p \leq 0,01$.

Zur Quantifizierung dieses SK-vermittelten Stromanstieges wurde der durch SK induzierte prozentuale Anstieg des Stromes – bezogen auf den Wert vor SK-Applikation – bestimmt (vgl. Abb. 21A). Dieser im Folgenden als **SK-Effekt** bezeichnete Stromanstieg entsprach beim $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ einer Aktivierung um $340 \pm 35 \%$ ($n = 52$; $N = 8$).

Im Zuge der Charakterisierung zeigte sich jedoch eine enorme Variabilität in der Höhe des SK-Effektes zwischen Oozyten verschiedener Donoren – unter ansonsten unveränderten Bedingungen. Wie in Abb. 22 vergleichend dargestellt, variierte der durch $0,3 \text{ dyn/cm}^2$ verursachte SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ zwischen mindestens $109 \pm 28 \%$ (Donor 8) und maximal $658 \pm 99 \%$ (Donor 2).

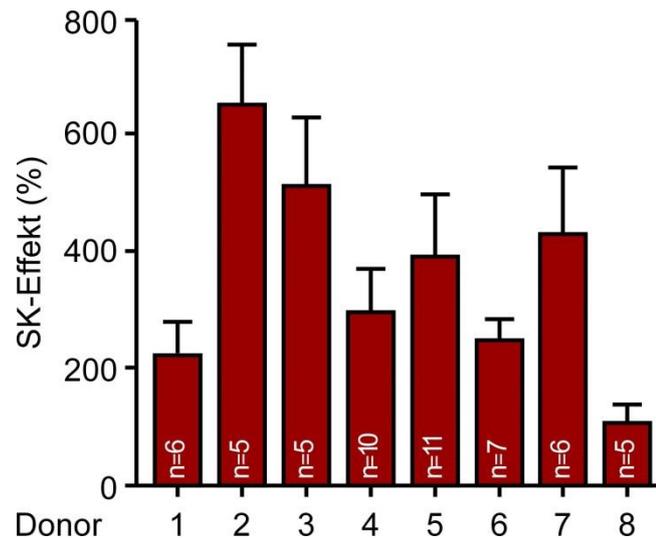


Abb. 22: Die Variabilität des SK-Effektes

Der Vergleich des SK-Effektes ($0,3 \text{ dyn/cm}^2$) von $\alpha\beta\text{ENaC}$ -exprimierenden Oozyten verschiedener Donoren (1 bis 8) zeigt eine starke Variabilität in der Höhe der Effekte.

Aus diesem Grund wurden zur besseren Vergleichbarkeit der SK-Effekte für alle folgenden Versuche Oozyten von mindestens drei verschiedenen Donoren pro Messreihe eingesetzt. Zudem wurden Messung und zugehörige Kontrolle stets an Oozyten desselben Donors durchgeführt.

1.1.1 Kontroll-Messungen

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem beobachteten SK-Effekt tatsächlich um einen ENaC-vermittelten Effekt handelte, wurde SK ($0,3 \text{ dyn/cm}^2$) sowohl in Anwesenheit des ENaC-Blockers Amilorid ($10 \mu\text{M}$; vgl. Abb. 23A), als auch auf Wasser-injizierte Kontroll-Oozyten appliziert (Abb. 23B).

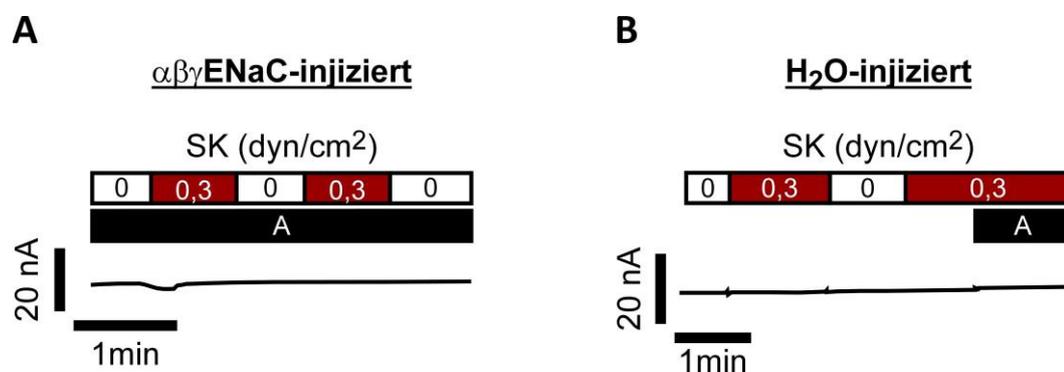


Abb. 23: Kontroll-Messungen zum Effekt von Scherkraft

A Die Applikation von SK ($0,3 \text{ dyn/cm}^2$, rote Balken) induzierte weder in Anwesenheit des ENaC-Blockers Amilorid (A, $10 \mu\text{M}$), noch an **B** Wasser(H_2O)-injizierten Kontroll-Oozyten einen Stromanstieg.

In beiden Fällen war kein Stromanstieg in Reaktion auf SK zu beobachten. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem SK-vermittelten Stromanstieg an ENaC-exprimierenden Oozyten (vgl. Abb. 21) um eine Aktivierung des Kanals handelte.

Die Oozyte ist – wie alle festen Oberflächen, welche sich in einer Lösung befinden – stets von einer dünnen Flüssigkeitsschicht umgeben (Costa *et al.* 1994; Zampighi *et al.* 1995; Supplisson und Bergman 1997). Dieses Phänomen wurde bereits im Jahre 1904 von Walther Nernst beschrieben und ist als *Nernst layer* oder auch *unstirred layer* bekannt (Nernst 1904; Chen *et al.* 1984). Es wird angenommen, dass der die Oozyte umgebende *unstirred layer* entweder der Vitellinhülle (Costa *et al.* 1994), und/oder den Mikrovilli der Zellmembran aufgelagert ist, bzw. durch sie gebildet wird (Zampighi *et al.* 1995; Supplisson und Bergman 1997). Die Konzentration der in Lösung befindlichen Substanzen (z.B. Ionen) innerhalb des *unstirred layers* unterscheidet sich dabei maßgeblich von derjenigen in der restlichen Bad-Lösung (Nič *et al.* 2009), so dass der *layer* eine Diffusions- und Transportbarriere für Moleküle oder Ionen zwischen Badlösung und Oozyte (bzw. dem ENaC) darstellt (Chen *et al.* 1984).

Die Dicke des *unstirred layer* korreliert dabei direkt mit der Fließgeschwindigkeit der die Zelle umspülenden Badlösung (Mackay und Meares 1959). Das bedeutet, je schneller die Perfusionsgeschwindigkeit, desto dünner der *unstirred layer* und desto effizienter die Diffusion der Ionen durch den *layer* hindurch (Nernst 1904; Mackay und Meares 1959).

Es wäre daher durchaus denkbar, dass Na⁺-Ionen durch das Anschalten der Perfusion (+ SK) schneller und in größerer Anzahl auf den ENaC treffen, als dies bei ausgeschalteter Perfusion (- SK) der Fall ist. Auf diese Weise wäre die Substratverfügbarkeit des Kanals erhöht, was wiederum einen vermehrten Einstrom von Na⁺ und damit den Stromanstieg in Reaktion auf SK bedingen könnte – der jedoch nicht auf eine mechanisch induzierte Aktivierung des ENaC zurückzuführen wäre.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde Na⁺ in aufsteigenden Konzentrationen (von 0 bis 140 mM) bei geringen, aber kontinuierlichen Scherkräften (0,01 dyn/cm²) auf ENaC-exprimierende Oozyten appliziert. Unterschiede in der Osmolarität wurden durch Zugabe entsprechender Mengen an Mannitol (Sigma) ausgeglichen. Diese Experimente basierten auf der folgenden Hypothese: Sollte der SK-Effekt auf eine erhöhte Na⁺-Verfügbarkeit zurückzuführen sein, dann sollte - bei gleichbleibender SK - die Erhöhung der Substratkonzentration von 90 mM (wie sie beim normalen ORi eingesetzt wird) auf 140 mM zu einem Stromanstieg führen. Das Ausbleiben eines Stromanstieges wäre indes ein Hinweis darauf, dass eine Erhöhung der Substratverfügbarkeit – wie sie evtl. durch eine erhöhte

Perfusionsgeschwindigkeit und die damit verbundene Reduzierung des *unstirred layers* entstehen könnte – nicht für den beobachteten SK-Effekt verantwortlich sein kann.

Die Erhöhung der extrazellulären Na^+ -Konzentration resultierte in einem stufenförmigen und dosisabhängigen Anstieg des I_M (vgl. Abb. 24A). Wie aus Abb. 24A und B ersichtlich, induzierte eine Erhöhung von 90 auf 140 mM keinen weiteren Anstieg des ENaC-vermittelten Stromes ($\Delta I_{\text{ENaC}}(90 \text{ mM}): 0,9 \pm 0,2 \mu\text{A}$; $\Delta I_{\text{ENaC}}(140 \text{ mM}): 1,0 \pm 0,2 \mu\text{A}$; $n = 14$; $N = 3$, $p = 0,5$; vgl. Abb. 24B).

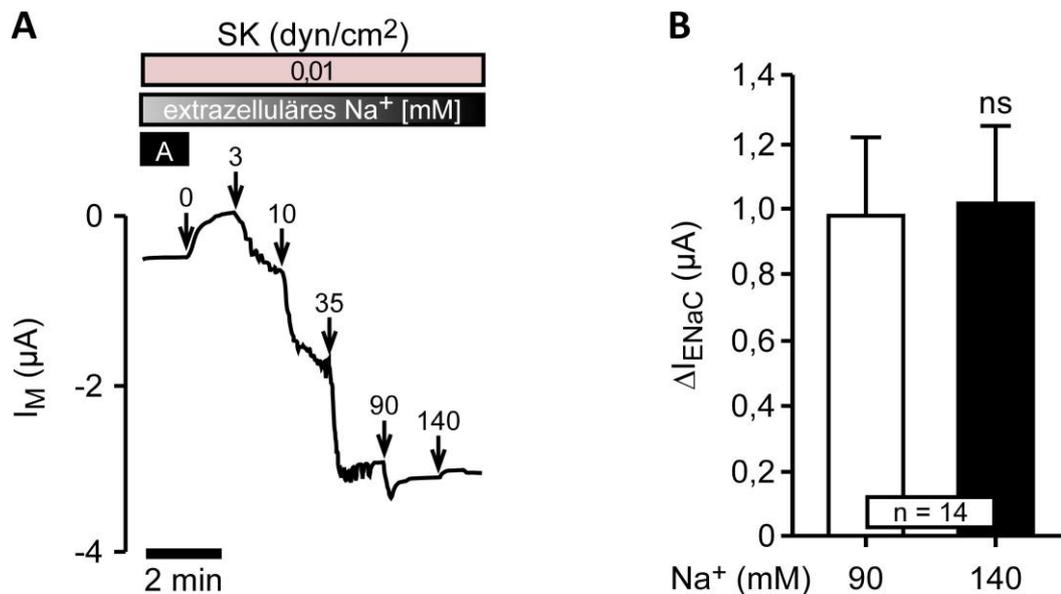


Abb. 24: Dosis-Wirkungskurve für extrazelluläres Na^+ am $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$

A Repräsentative Stromspur einer $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ -exprimierenden Oozyte. Aufsteigende extrazelluläre Na^+ -Konzentrationen resultierten in einem stufenförmigen Anstieg des I_M . **B** Die Erhöhung von 90 auf 140 mM Na^+ - führte zu keiner signifikanten Änderung des ΔI_{ENaC} . ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$.

Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass der SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ nicht auf einer erhöhten Na^+ -Verfügbarkeit, sondern tatsächlich auf einer mechanosensitiven Aktivierung des Kanals beruht.

1.2 $\delta\beta\gamma\text{ENaC}$

Um zu überprüfen, ob der $\delta\beta\gamma\text{ENaC}$ ebenso wie der $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ durch SK aktiviert werden kann, wurden beide Isoformen der δ -Untereinheit ($\delta 1$ und $\delta 2$), jeweils in Kombination mit den Untereinheiten β und γ , in Oozyten exprimiert und ihre Reaktion auf SK ($0,3 \text{ dyn/cm}^2$) charakterisiert. Zur Bestimmung des ΔI_{ENaC} wurde, analog zu den vorhergehenden Messungen, am Ende jedes Experimentes Amilorid appliziert. Da der $\delta\beta\gamma\text{ENaC}$ eine im Vergleich zum $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ geringere Affinität für Amilorid besitzt (Giraldez 2012), wurde bei den den $\delta\beta\gamma\text{ENaC}$ betreffenden Messungen stets eine Konzentration von $100 \mu\text{M}$ eingesetzt.

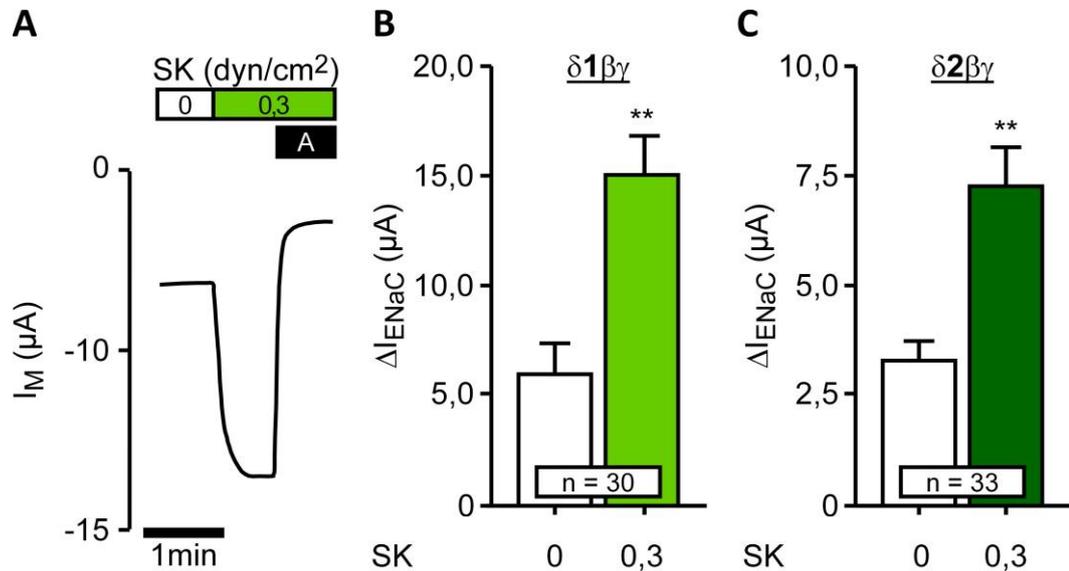


Abb. 25: Der Einfluss von Scherkraft auf beide Isoformen des $\delta\beta\gamma$ ENaC

A Repräsentative Stromspur einer $\delta 1\beta\gamma$ ENaC exprimierenden Oozyte. Applikation von SK (0,3 dyn/cm², grüner Balken) induzierte einen raschen Stromanstieg. Abschließende Applikation von Amilorid (A, 100 μ M) diente der Quantifizierung des ENaC-vermittelten Stromes (ΔI_{ENaC}). **B** Statistische Auswertung des in A dargestellten Experiments. Der ENaC-vermittelte Strom (ΔI_{ENaC}) ist sowohl beim $\delta 1\beta\gamma$ - (dargestellt in hellgrün), als auch beim $\delta 2\beta\gamma$ ENaC (dunkelgrün, **C**) unter Scherkraft (0,3) signifikant höher als unter Kontrollbedingungen (0, ohne Scherkraft). **: $p \leq 0,01$.

Beide Isoformen konnten durch SK (0,3 dyn/cm²) aktiviert werden (Abb. 25A – C). Der ΔI_{ENaC} des $\delta 1\beta\gamma$ ENaC stieg von zunächst $6,0 \pm 1,1 \mu\text{A}$ nach SK-Applikation auf $15,0 \pm 1,7 \mu\text{A}$ an ($n = 30$; $N = 5$; $p \leq 0,01$, Abb. 25B). Dies entsprach einem SK-Effekt von $95 \pm 16 \%$ ($n = 30$; $N = 5$).

Beim $\delta 2\beta\gamma$ ENaC war durch SK ein Anstieg des Stromes von $3,3 \pm 0,4 \mu\text{A}$ auf $7,3 \pm 0,9 \mu\text{A}$ ($n = 33$; $N = 6$; $p \leq 0,01$; Abb. 25C) zu verzeichnen, was einem SK-Effekt von $105 \pm 13 \%$ ($n = 33$; $N = 6$) entsprach. Die SK-Effekte beider $\delta\beta\gamma$ ENaC-Isoformen waren damit untereinander nicht verschieden ($p \geq 0,05$). Vergleichend sind diese Ergebnisse in Abb. 26 gegenübergestellt.

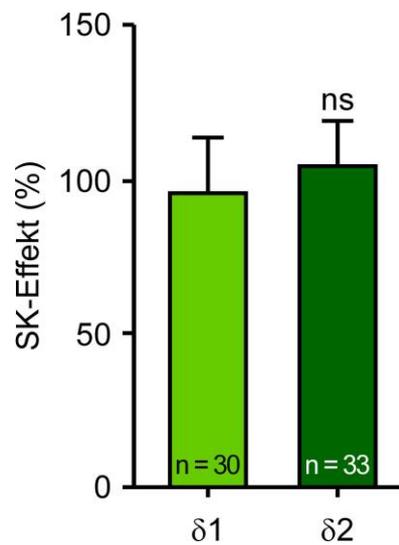


Abb. 26: Beide Isoformen des $\delta\beta\gamma$ ENaC wurden in gleichem Ausmaß durch Scherkraft aktiviert

Statistischer Vergleich des durch $0,3 \text{ dyn/cm}^2$ hervorgerufenen SK-Effektes am $\delta 1\beta\gamma$ - ($\delta 1$), bzw. $\delta 2\beta\gamma$ ENaC ($\delta 2$). Beide Isoformen wurden in gleichem Ausmaß durch Scherkraft aktiviert. ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$.

1.2.1 Kontroll-Messungen

Wie aus Abb. 27 ersichtlich, zeigte sich in Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ Amilorid (und damit einer Hemmung des Kanals) weder beim $\delta 1$ - noch beim $\delta 2\beta\gamma$ ENaC eine Beeinflussung des Stromverlaufes in Reaktion auf SK.

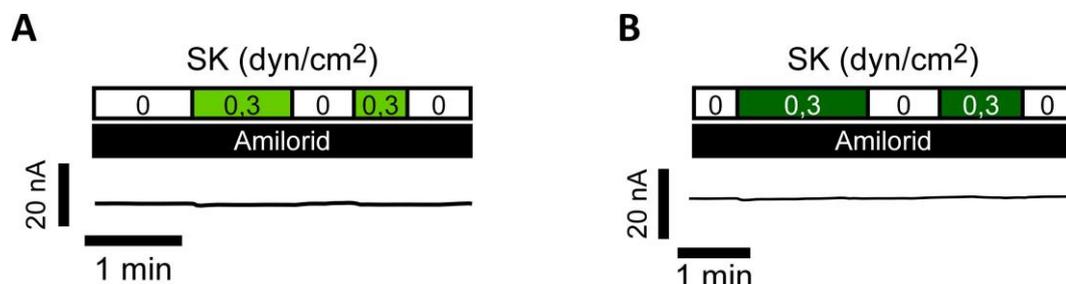


Abb. 27: Kontrollen zum Effekt von Scherkraft auf den $\delta\beta\gamma$ ENaC

In Anwesenheit des ENaC-Blockers Amilorid ($100 \mu\text{M}$) unterblieb der SK-vermittelte Stromanstieg sowohl beim $\delta 1$ - (hellgrün), als auch beim $\delta 2\beta\gamma$ ENaC (dunkelgrün).

Auch für den $\delta\beta\gamma$ ENaC wurden (analog zu Abschnitt 3.1.1) zusätzliche Messungen durchgeführt, in denen die extrazelluläre Na^+ -Konzentration bei geringen Scherkräften ($0,01 \text{ dyn/cm}^2$) schrittweise erhöht wurde, um eine vermehrte Substratverfügbarkeit als Ursache für den SK-Effekt auszuschließen. Zu diesem Zweck wurden Na^+ -Konzentrationen zwischen 0 und 200 mM eingesetzt. Die Osmolarität wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge an Mannitol ausgeglichen.

Hier zeigte sich, dass eine Erhöhung der Na^+ -Konzentration von 90 mM (wie sie beim normalen ORi eingesetzt wird) auf 140 mM in einem deutlichen Stromanstieg resultierte (siehe

Abb. 28). Auch die darauffolgende Anhebung auf 170 mM Na⁺ führte zu einer additiven Stimulation des Stromes. Weitere Erhöhung der Na⁺-Konzentration auf 200 mM induzierte hingegen eine Abnahme des I_M. Eine Auflistung der absoluten Stromwerte ist in Tab. 23 dargestellt.

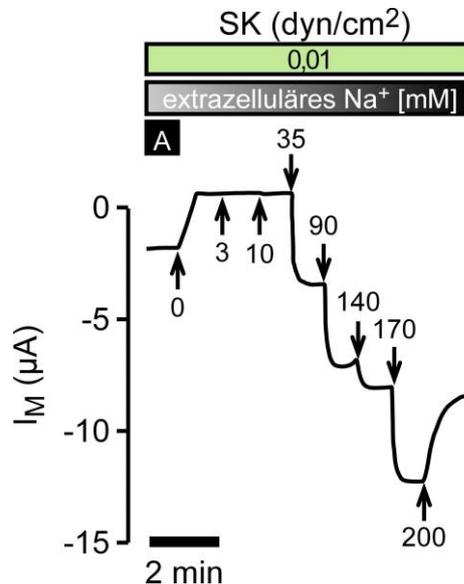


Abb. 28: Dosis-Wirkungskurve für extrazelluläres Na⁺ am δ1βγENaC

Erhöhung der extrazellulären Na⁺-Konzentration von Na⁺-frei (0) auf 200 mM Na⁺ bei einwirkender Scherkraft (SK) von 0,01 dyn/cm² resultierte in einem stufenförmigen Anstieg des transmembranen Stromes (I_M). Lediglich die Erhöhung von 170 auf 200 mM resultierte in einer Abnahme des I_M.

Tab. 23: Absolute Stromwerte (I_M) des δ1- und δ2βγENaC bei schrittweiser Erhöhung der extrazellulären Na⁺-Konzentration

Na ⁺ -Konzentration (mM)	I _M (µA)	
	δ1βγ	δ2βγ
0	+2,4 ± 0,7	+0,5 ± 0,2
3	+1,3 ± 0,6 **	+0,4 ± 0,1 ns
10	-0,2 ± 0,3 *	-0,3 ± 0,1 **
35	-3,8 ± 0,8 **	-1,4 ± 0,3 **
90	-7,5 ± 1,3 **	-2,8 ± 0,4 **
140	-9,1 ± 1,5 **	-3,3 ± 0,4 **
170	-13,1 ± 2,4 **	-4,1 ± 0,6 **
200	-10,2 ± 1,5 **	-3,4 ± 0,3 *

ns (nicht signifikant): p ≥ 0,05; *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01; bezieht sich jeweils auf den vorherigen Wert.

Dieser Befund lieferte Grund zu der Annahme, dass der Stromanstieg des δβγENaC in Reaktion auf SK unter ORi (90 mM Na⁺) durchaus auf eine vermehrte Substratverfügbarkeit

in Folge der reduzierten Dicke des *unstirred layer* – und nicht auf eine mechanisch induzierte Aktivierung – zurückzuführen sein könnte.

Falls dies zuträfe, dann sollte der SK-Effekt bei einer erhöhten extrazellulären Na^+ -Konzentration von 170 mM reduziert sein – bzw. sogar eine Inhibition des Stromes verursachen, da die Erhöhung der Na^+ -Konzentration von 170 auf 200 mM in einer Hemmung des $\delta\beta\gamma\text{ENaCs}$ resultierte (vgl. Abb. 28). Im umgekehrten Falle jedoch müsste die Höhe des SK-Effekts, sollte dieser ausschließlich auf einer mechanosensitiven Aktivierung (und nicht auf einer erhöhten Substratverfügbarkeit) des $\delta\beta\gamma\text{ENaC}$ beruhen, durch die erhöhte Na^+ -Konzentration nicht beeinflusst werden.

Zu diesem Zweck wurde der SK-Effekt durch Erhöhung der SK von 0 auf $0,3 \text{ dyn/cm}^2$ sowohl unter Kontrollbedingungen (ORi, 90 mM Na^+), als auch in Anwesenheit von 170 mM Na^+ bestimmt. Um eine mögliche Beeinflussung des SK-Effektes durch die erhöhte Osmolarität der 170 mM Na^+ -Lösung auszuschließen, wurde der SK-Effekt auch unter ORI (90 mM Na^+) bestimmt, welcher zum osmotischen Ausgleich zusätzlich 160 mM Mannitol enthielt.

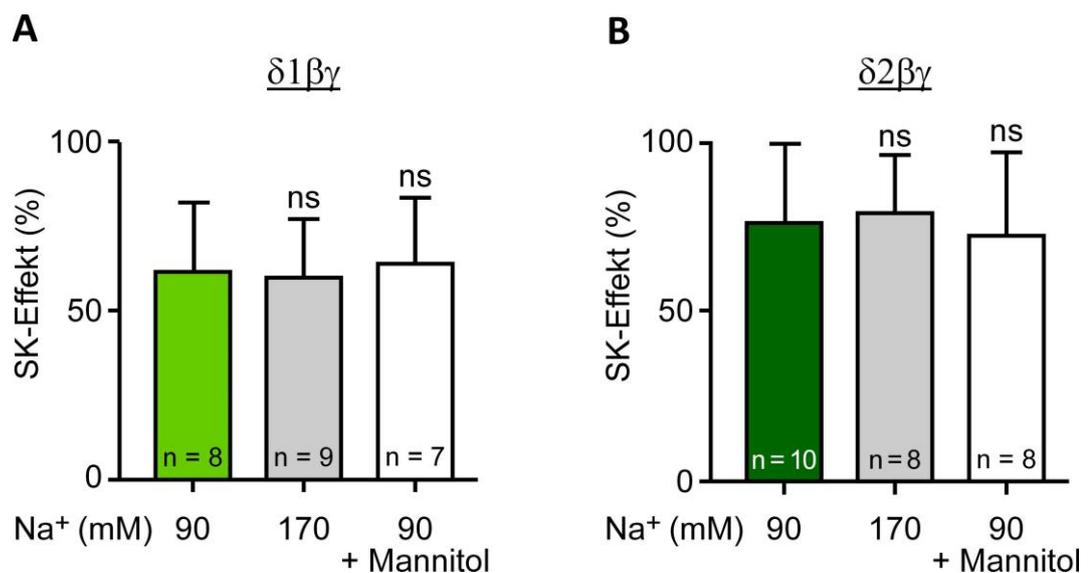


Abb. 29: Der SK-Effekt des $\delta\beta\gamma\text{ENaC}$ bei erhöhter Na^+ -Konzentration, bzw. Osmolarität

A Die SK-Effekte des $\delta 1\beta\gamma$ - und $\delta 2\beta\gamma\text{ENaC}$ (**B**) unterschieden sich in Gegenwart einer erhöhten Na^+ -Konzentration (170), bzw. Hyperosmolarität der Lösung (+Mannitol) nicht von denjenigen unter Kontrollbedingungen (90mM Na^+). ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$; bezieht sich jeweils auf die Kontrolle (90 mM Na^+).

Wie aus Abb. 29 ersichtlich, beeinflusste weder die Erhöhung der extrazellulären Na^+ -Konzentration noch der Osmolarität die Amplitude des SK-Effektes am $\delta 1\beta\gamma\text{ENaC}$. Unter Kontrollbedingungen (90 mM Na^+) betrug der SK-Effekt $61 \pm 20 \%$ ($n = 8$; $N = 3$) und unterschied sich damit nicht von demjenigen unter 170 mM Na^+ (SK-Effekt: $60 \pm 17 \%$; $n = 8$; $N = 3$; $p = 0,9$), sowie erhöhter Osmolarität (SK-Effekt: $64 \pm 19 \%$; $n = 9$; $N = 3$; $p = 0,9$).

Für den $\delta 2\beta\gamma\text{ENaC}$ ergab sich ein ähnliches Bild (vgl. Abb. 29B). Hier wurde die Aktivität des Kanals durch SK um $77 \pm 23 \%$ gesteigert ($n = 10$; $N = 3$). Weder bei erhöhter Na^+ -Konzentration (SK-Effekt: $79 \pm 17 \%$; $n = 8$; $N = 3$; $p = 0,9$), noch erhöhter Osmolarität ($73 \pm 23 \%$; $n = 8$; $N = 3$; $p = 0,9$) zeigte sich eine Beeinflussung des SK-Effektes.

Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Aktivitätserhöhung des $\delta\beta\gamma\text{ENaC}$ in Reaktion auf SK ebenso wie die des $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ nicht auf eine Reduktion des *unstirred layer* und damit eine erhöhte Substratverfügbarkeit zurückzuführen war, sondern dass es sich bei der Aktivitätserhöhung um einen mechanisch induzierten Effekt handelte.

2 Charakterisierung des SK-Effektes

2.1 Reversibilität

2.1.1 $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$

Zur weiteren Charakterisierung des SK-Effektes wurden Oozyten wiederholt (dreimal) SK in Höhe von $0,3 \text{ dyn/cm}^2$ ausgesetzt, jeweils unterbrochen durch das Stoppen der Perfusion. Wie aus Abb. 30 ersichtlich, war der SK-Effekt am $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ vollständig reversibel und repetitiv, wobei kein signifikanter Unterschied in der Amplitude der drei aufeinanderfolgenden SK-Effekte beobachtet werden konnte (1. SK-Effekt: $214 \pm 57 \%$; 2. SK-Effekt: $218 \pm 48 \%$; 3. SK-Effekt: $188 \pm 41 \%$, $n = 7$; $N = 3$; $p \geq 0,05$; vgl. Abb. 30C).

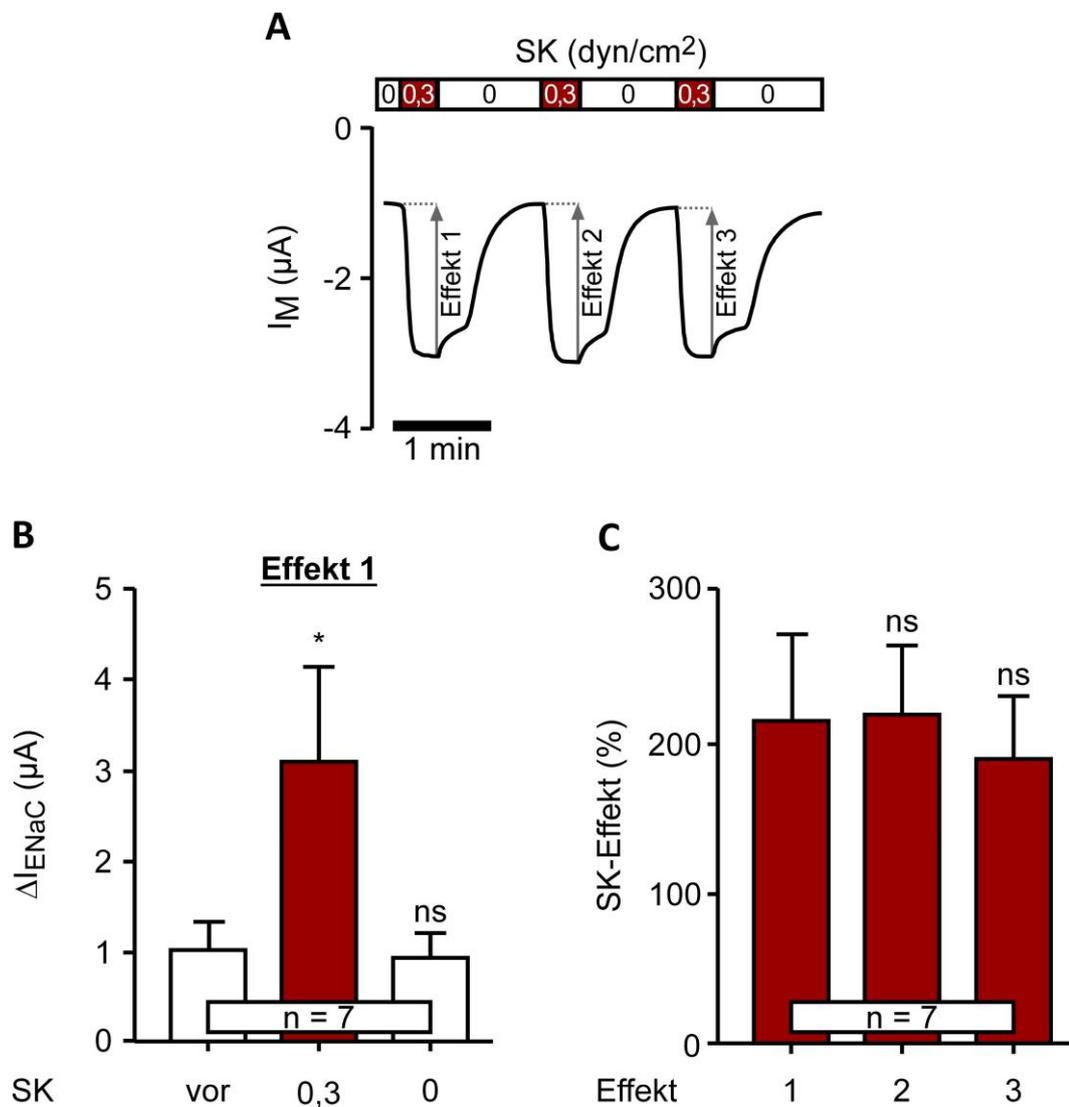


Abb. 30: Der $\alpha\beta\gamma$ ENaC wurde reversibel und repetitiv durch Scherkräfte aktiviert

A Stromspur einer $\alpha\beta\gamma$ ENaC-exprimierenden Oozyte, welche einer dreimaligen Applikation von SK (0,3; rote Balken) ausgesetzt war - jeweils unterbrochen durch das Stoppen der Perfusion (0; weiße Balken). SK resultierte stets in einem raschen und vollständig reversiblen Anstieg des transmembranen Stromes (I_M). **B** Statistische Auswertung des ersten in Abbildung A dargestellten SK-Effektes. Der Anstieg des ΔI_{ENaC} in Reaktion auf SK war vollständig reversibel. ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$; *: $p \leq 0,05$; jeweils bezogen auf den Wert vor SK-Applikation (vor). **C** Der SK-Effekt konnte dreimalig in Folge wiederholt werden, wobei sich die Amplituden der drei Effekte nicht signifikant voneinander unterschieden. ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$; jeweils bezogen auf den ersten SK-Effekt.

2.1.2 $\delta\beta\gamma$ ENaC

Analog zu den vorherigen Messungen wurde auch der SK-Effekt des $\delta\beta\gamma$ ENaC auf seine Reversibilität hin untersucht. Hier stieg der ΔI_{ENaC} bei erstmaliger SK-Applikation (0,3 dyn/cm²) um 134 ± 26 % (n = 8; N = 3) an. Wie sowohl aus dem Stromverlauf in Abb. 31A, als auch der statistischen Auswertung entnehmbar (vgl. Abb. 31B, C), war der SK-Effekt des $\delta\beta\gamma$ ENaC – konträr zu den am $\alpha\beta\gamma$ ENaC gewonnenen Daten – zwar repetitiv, jedoch nicht vollständig reversibel.

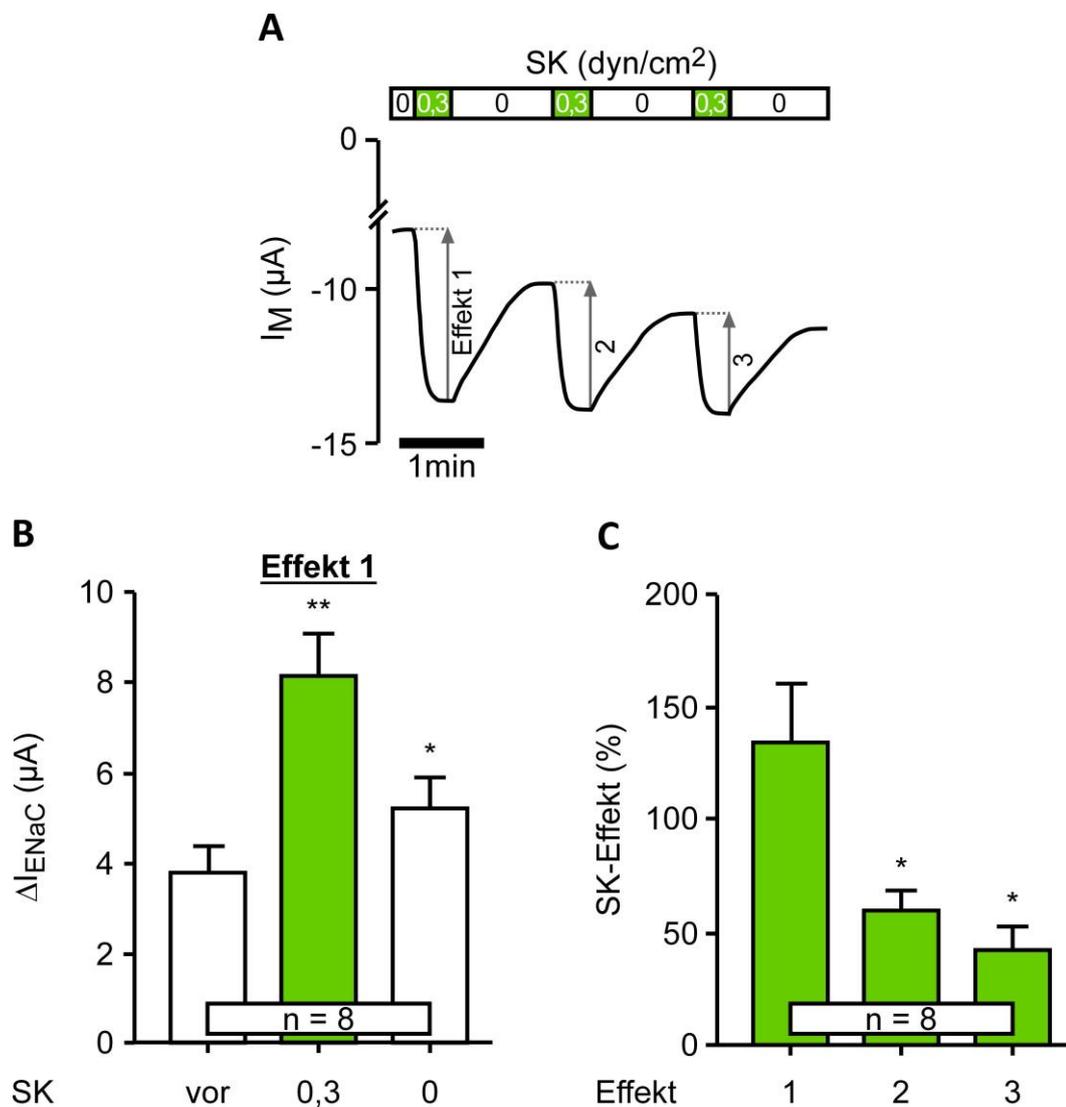


Abb. 31: Der $\delta 1\beta\gamma ENaC$ wird repetitiv, jedoch nicht vollständig reversibel durch Scherkräfte aktiviert

A Stromspur einer $\delta 1\beta\gamma ENaC$ -exprimierenden Oozyte. Die dreimalige Applikation von SK ($0 \rightarrow 0,3$ dyn/cm²) resultierte zwar stets in einem Anstieg des transmembranen Stromes (I_M), dieser Effekt war jedoch nicht vollständig reversibel. **B** Statistische Auswertung des ersten SK-Effektes (Effekt 1). Der ΔI_{ENaC} nach Ausschalten der Perfusion (0) war signifikant höher als vor SK-Applikation (vor). *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; jeweils bezogen auf den Wert vor SK-Applikation (vor). **C** Die Amplitude des SK-Effektes nahm bei dreimaliger SK-Applikation (Effekt 1 bis 3) ab. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; jeweils bezogen auf den ersten SK-Effekt.

Der ΔI_{ENaC} kehrte nach dem Ausschalten der Perfusion nicht auf den gleichen Wert wie vor SK-Applikation zurück, sondern äquilibrierte auf einem signifikant höheren Niveau (vgl. Abb. 31B). Obwohl der SK-Effekt auch beim $\delta 1\beta\gamma ENaC$ repetitiv war und dreimal in Folge ausgelöst werden konnte, war die Höhe der durch SK induzierten Aktivitätserhöhung daher bei den beiden folgenden Effekten signifikant geringer als beim ersten SK-Effekt (2. SK-Effekt: $60 \pm 8\%$; 3. SK-Effekt: $42 \pm 8\%$; $n = 8$; $N = 3$; $p \leq 0,05$; vgl. Abb. 31C).

Auch beim $\delta 2\beta\gamma ENaC$ zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den drei SK-Effekten (1. SK-Effekt: $125 \pm 41\%$; 2. SK-Effekt: $50 \pm 20\%$; 3. SK-Effekt: $35 \pm 17\%$,

$n = 7$; $N = 3$; $p \geq 0,05$, vgl. Abb. 32B), da der SK-Effekt auch hier nicht vollständig reversibel war (siehe Abb. 32A).

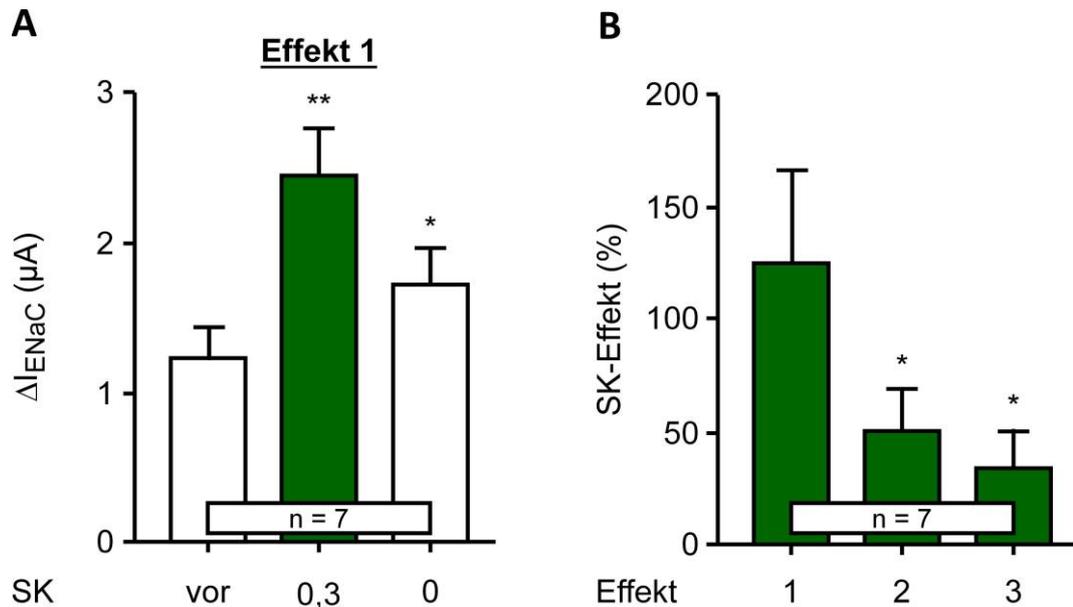


Abb. 32: Die Repetitivität und Reversibilität des $\delta 2\beta\gamma\text{ENaC}$

A Nach Applikation von SK ($0 \rightarrow 0,3 \text{ dyn/cm}^2$) war der ENaC-vermittelte Strom (ΔI_{ENaC}) des $\delta 2\beta\gamma\text{ENaC}$ signifikant höher (0,3) als zuvor (vor), kehrt jedoch nach dem Stoppen der Perfusion nicht auf den gleichen Wert zurück (0). *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; jeweils bezogen auf den Wert vor SK-Applikation (vor) **B** Die Höhe des SK-Effektes am $\delta 2\beta\gamma\text{ENaC}$ nahm bei dreimaliger SK-Applikation (Effekt 1 bis 3) ab. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; jeweils bezogen auf den ersten SK-Effekt.

2.2 Dosisabhängigkeit des SK-Effektes

2.2.1 $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$

Weitere Experimente beschäftigten sich mit einer potentiellen Dosisabhängigkeit des SK-Effektes. Hierfür wurden ENaC-exprimierende Oozyten Scherkräften in physiologisch relevanten Größenordnungen ($0 \rightarrow 0,001 / 0,01 / 0,04 / 0,3$ oder $1,3 \text{ dyn/cm}^2$) ausgesetzt und die jeweilige Amplitude des SK-Effektes bestimmt. Es zeigte sich, dass die SK-induzierte Aktivierung des ENaC dosisabhängig erfolgte (vgl. Abb. 33A-C).

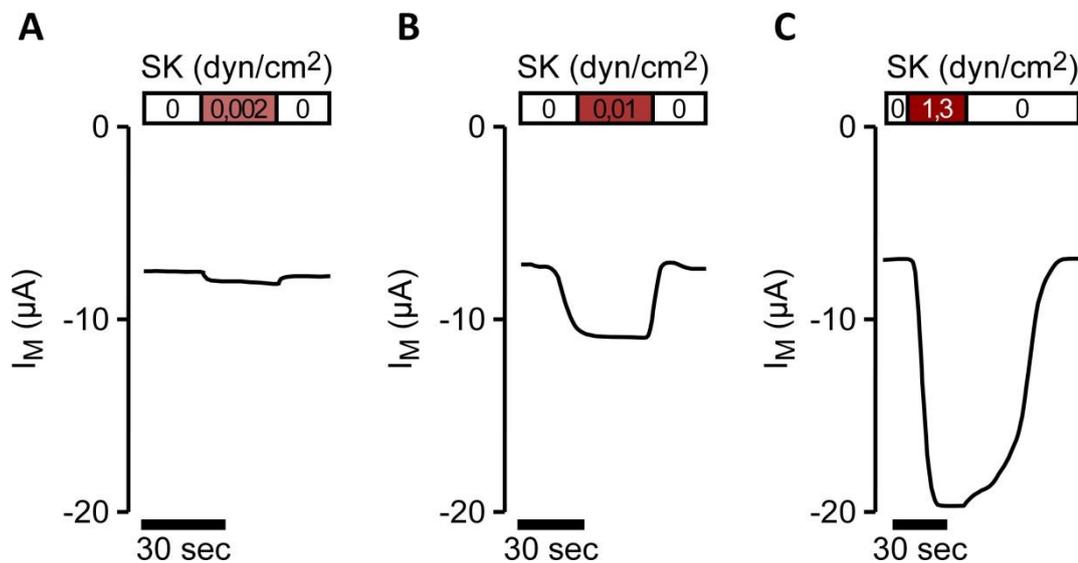


Abb. 33: Die Dosis-Abhängigkeit des SK-Effektes bei $\alpha\beta\gamma$ ENaC exprimierenden Oozyten.

A Die Applikation von SK in Höhe von 0,002, sowie 0,01 (**B**) und 1,3 dyn/cm² (**C**) induzierte eine dosisabhängige und reversible Aktivierung des I_M . Die gezeigten Messungen wurden stets an derselben $\alpha\beta\gamma$ ENaC-exprimierenden Oozyte durchgeführt.

Zur Bestimmung derjenigen SK-Rate, durch welche der $\alpha\beta\gamma$ ENaC halbmaximal aktiviert wird (EC_{50}), wurde zunächst der SK-Effekt bei verschiedenen Scherkräften bestimmt. Die auf diese Weise erhaltenen Mittelwerte wurden daraufhin mit Hilfe der *Hill-Gleichung* angeglichen. Hieraus ergab sich für den $\alpha\beta\gamma$ ENaC ein EC_{50} von 0,01 dyn/cm² (vgl. Abb. 34).

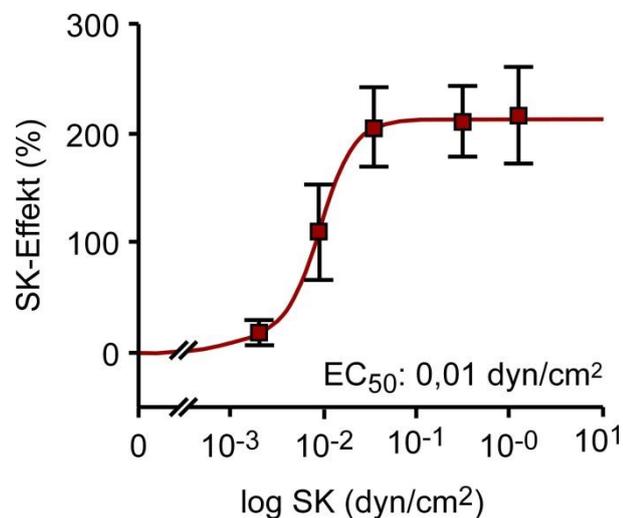


Abb. 34: Die Dosisabhängige Aktivierung des $\alpha\beta\gamma$ ENaC durch Scherkraft

Zur Bestimmung der mittleren effektiven SK-Rate (EC_{50}) wurden die SK-Effekte mittels der *Hill-Gleichung* angeglichen. Dies ergab ein EC_{50} von 0,01 dyn/cm². n = 8; N = 3.

2.2.2 $\delta\beta\gamma$ ENaC

Analoge Experimente wurden an beiden Isoformen des $\delta\beta\gamma$ ENaC durchgeführt. Sowohl beim $\delta1\beta\gamma$ -, als auch beim $\delta2\beta\gamma$ ENaC zeigte sich eine dosisabhängige Aktivierung in Reaktion auf Scherkraft. (vgl. Abb. 35).

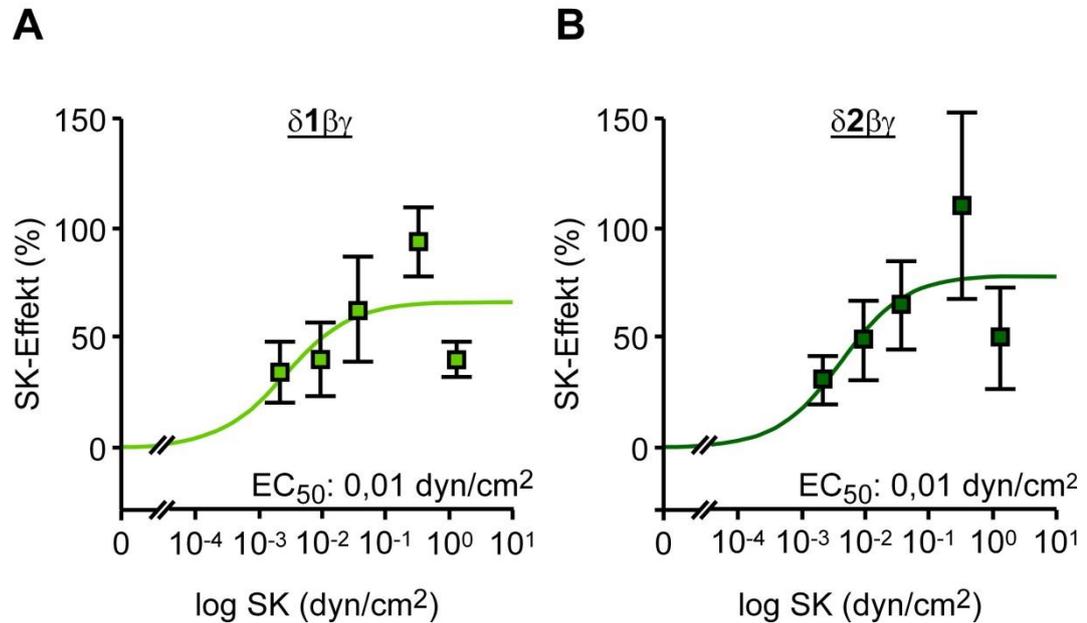


Abb. 35: Die Dosisabhängige Aktivierung des $\delta\beta\gamma$ ENaC durch Scherkraft

Beide $\delta\beta\gamma$ ENaC-Isoformen $\delta1$ (A) und $\delta2$ (B) wurden durch Scherkräfte dosisabhängig aktiviert. n = 9; N = 3.

Die Angleichung der Mittelwerte mittels der *Hill-Gleichung* ergab für den $\delta1$ -, ebenso wie den $\delta2\beta\gamma$ ENaC, einen EC₅₀ von 0,01 dyn/cm².

Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass es sich sowohl beim $\alpha\beta\gamma$ ENaC, als auch bei beiden $\delta\beta\gamma$ ENaC-Isoformen um mechanosensitive Ionenkanäle handelt. Beide Kanäle werden durch Scherkräfte repetitiv aktiviert, wobei das Ausmaß der Aktivierung dosisabhängig erfolgt. Unterschiede zeigten sich jedoch im Ausmaß und der Reversibilität der durch SK induzierten Aktivierung.

Die weiterführenden Untersuchungen dienen der Charakterisierung des Mechanismus, welcher der Detektion von SK und damit der mechanischen Regulation des ENaC zugrunde liegt. Im Fokus der Experimente standen dabei die großen Extrazellulären Domänen der ENaC-Untereinheiten und deren mögliche Interaktion mit der die Zelle bedeckenden Extrazellulären Matrix.

3 Einfluss der Extrazellulären Matrix auf den SK-Effekt

Einen direkten Nachweis über eine Interaktion zwischen dem ENaC und der Extrazellulären Matrix gab es bisher nicht. Die Extrazelluläre Matrix gilt jedoch vor allem in Endothelzellen als „Scherkraft-Sensor“, welche Änderungen in der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes detektiert (Tarbell und Ebong 2008). Zudem wurde die Expression von ENaCs in der luminalen Membran dieser Zellen bereits nachgewiesen (Wang *et al.* 2009). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde deshalb die Hypothese formuliert, dass es einen kooperativen Effekt zwischen der Extrazellulären Matrix und dem ENaC geben könnte, über welchen mechanische Stimuli auf den Kanal übertragen werden und so zu dessen Aktivitätserhöhung führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden daher die verschiedenen Komponenten der Extrazellulären Matrix der *Xenopus*-Oozyten entfernt, um eine mögliche Veränderung der mechanischen Aktivierung des ENaC zu detektieren. Die tatsächliche Degradierung der Extrazellulären Matrix wurde anschließend mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) nachgewiesen.

3.1 Degradierung der Extrazellulären Matrix

Um den Einfluss verschiedener Komponenten der Extrazellulären Matrix in der SK-Wahrnehmung zu charakterisieren, wurden diese sowohl mechanisch, als auch enzymatisch mittels gegen Strukturbestandteile der Extrazellulären Matrix gerichteter Enzyme degradiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde der ENaC heterolog in diesen Oozyten exprimiert und der SK-Effekt bestimmt. Als Kontrolle dienten jeweils Oozyten mit unbehandelter (intakter) Extrazellulärer Matrix. Die Oozyten wurden direkt im Anschluss an die Messung in eine Fixationslösung eingebracht und die erfolgreiche Entfernung der Extrazellulären Matrix in Kooperation mit G. Magdowski (*Institut für Anatomie und Zellphysiologie*, JLU Gießen) mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) verifiziert.

3.1.1 Rasterelektronenmikroskopischer Nachweis zur Degradierung der Extrazellulären Matrix

Zum Nachweis der Degradierung der Extrazellulären Matrix wurde die Oberfläche der unbehandelten Kontroll-Oozyten, als auch der den unterschiedlichen Behandlungsansätzen unterzogenen Oozyten (devitellinisiert, Enzym-inkubiert und beides in Kombination) mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) dargestellt.

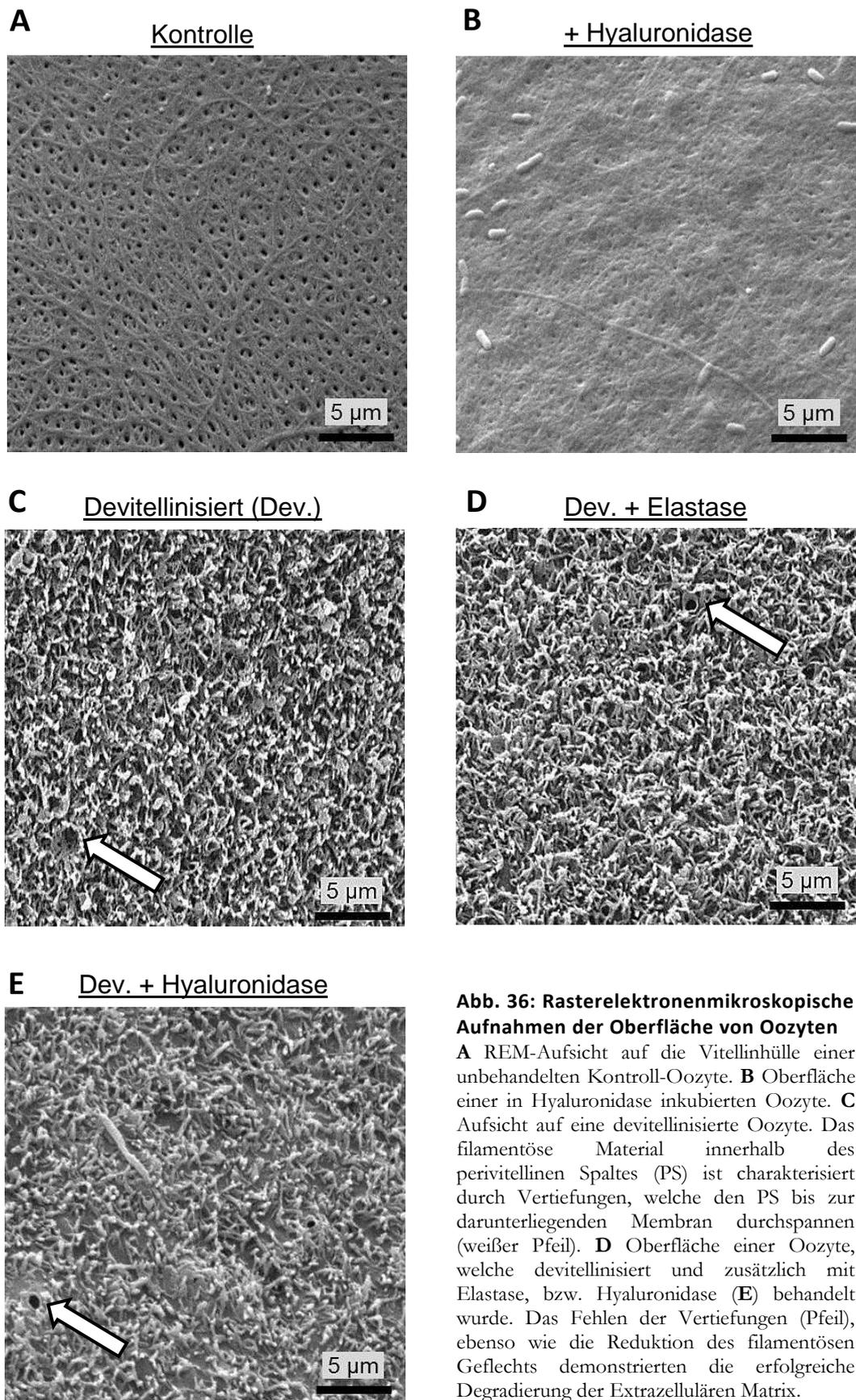


Abb. 36: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche von Oozyten

A REM-Aufsicht auf die Vitellinhülle einer unbehandelten Kontroll-Oozyte. **B** Oberfläche einer in Hyaluronidase inkubierten Oozyte. **C** Aufsicht auf eine devitellinisierte Oozyte. Das filamentöse Material innerhalb des perivitellinen Spaltes (PS) ist charakterisiert durch Vertiefungen, welche den PS bis zur darunterliegenden Membran durchspannen (weißer Pfeil). **D** Oberfläche einer Oozyte, welche devitellinisiert und zusätzlich mit Elastase, bzw. Hyaluronidase (**E**) behandelt wurde. Das Fehlen der Vertiefungen (Pfeil), ebenso wie die Reduktion des filamentösen Geflechts demonstrierten die erfolgreiche Degradierung der Extrazellulären Matrix.

Bei unbehandelten Kontroll-Oozyten war die faserige Vitellinhülle deutlich erkennbar (siehe Abb. 36A), welche durch die Behandlung mit Hyaluronidase nicht degradiert werden konnte (Abb. 36B). Das mechanische Entfernen der Vitellinhülle hingegen erlaubte den Blick auf das filamentöse Material innerhalb des perivitellinen Spaltes (Abb. 36C). Dieses Material war unterbrochen durch Vertiefungen, welche den perivitellinen Spalt bis zur darunterliegenden Membran durchspannten. Mittels der Behandlung mit Hyaluronidase (Abb. 36D), bzw. Elastase (Abb. 36E) konnten diese Strukturen reduziert werden.

3.1.2 Charakterisierung des SK-Effekts bei degradierter Extrazellulärer Matrix

Da die Oozyten in Folge der Degradierung der Extrazellulären Matrix eine stark erhöhte Fragilität aufwiesen, wurde der SK-Effekt bestimmt, indem die einwirkenden Scherkräfte lediglich von 0,01 auf 0,2 dyn/cm² erhöht wurden, anstatt wie in den vorhergehenden Messreihen die Perfusion von 0 auf 0,3 dyn/cm² zu starten. Dies bedingte zwar einen im Vergleich zu den vorhergehenden Messungen geringeren SK-Effekt, bewahrte die Oozyten jedoch vor der Ruptur.

Bestimmung des SK-Effektes an devitellinisierten Oozyten

Die Devitellinisierung $\alpha\beta\gamma$ ENaC-exprimierender Oozyten beeinflusste die Höhe des SK-Effektes nicht. Dieser betrug unter Kontrollbedingungen $23 \pm 4\%$ (n = 6; N = 3) und an devitellinisierten Oozyten $27 \pm 8\%$ (n = 6; N = 3, p = 0,7; vgl. Abb. 37).

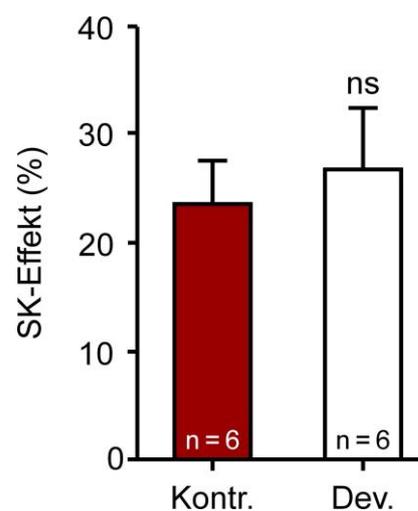


Abb. 37: Die Vitellinhülle hat keinen Einfluss auf die Höhe des SK-Effektes

Durch das Entfernen der Vitellinhülle (Dev.) wurde der SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC im Vergleich zur Kontrolle (an Oozyten mit Vitellinhülle) nicht beeinflusst. ns (nicht signifikant): p \geq 0,05.

Bestimmung des SK-Effektes nach Inkubation der Oozyten in Elastase

Auch die Inkubation der Oozyten in Elastase und damit dem Abbau von Elastin zeigte keine Beeinflussung des SK-Effekts (Kontrolle: 31 ± 11 %; $n = 10$; $N = 3$; Elastase-inkubiert: 26 ± 3 %; $n = 9$; $N = 3$; $p = 0,7$; vgl. Abb. 38). In einem dritten Versuchsansatz wurden beide Behandlungen miteinander kombiniert. Hierfür wurden zuvor devitellinisierte Oozyten in Elastasehaltiger Ringerlösung inkubiert. Auch durch diese Behandlung wurde der SK-Effekt im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinflusst (27 ± 9 %; $n = 8$; $N = 3$; $p = 0,7$; siehe Abb. 38).

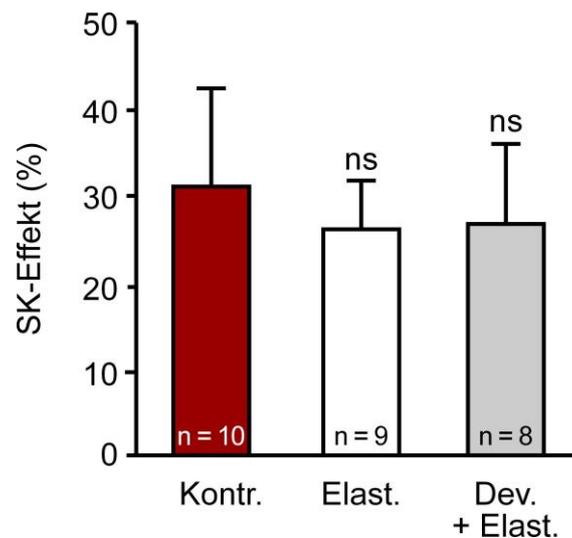


Abb. 38: Die Degradierung von Elastin beeinflusste den SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC nicht

Weder das Entfernen von Elastin mittels des Enzyms Elastase (Elast.), noch eine Kombination aus Devitellinisierung und anschließender Elastase-Inkubation (Dev. + Elast.) beeinflussten den SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC. Die Signifikanzniveaus ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$ beziehen sich jeweils auf den SK-Effekt an Kontroll-Oozyten (Kontr.; mit intakter Extrazellulärer Matrix).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass weder die Vitellinhülle, noch in der Extrazellulären Matrix der Oozyten vorhandenes Elastin für die Detektion und anschließende Transduktion von Scherkräften auf den $\alpha\beta\gamma$ ENaC essentiell sind. Weiterführende Experimente fokussierten sich daher auf einen weiteren Bestandteil der Extrazellulären Matrix – die Hyaluronsäure. Zu deren Abbau wurde sich des Enzyms Hyaluronidase bedient.

Charakterisierung des SK-Effektes nach Hyaluronidase-Inkubation

Auch die Inkubation der Oozyten in Hyaluronidase zeigte keine Auswirkung auf die Amplitude des SK-Effektes. Dieser betrug unter Kontroll-Bedingungen $12 \pm 3\%$ ($n = 9$; $N = 3$) und unterschied sich damit nicht signifikant von demjenigen an Oozyten nach Hyaluronidase-Inkubation ($13 \pm 3\%$; $n = 13$; $N = 3$; $p = 0,8$).

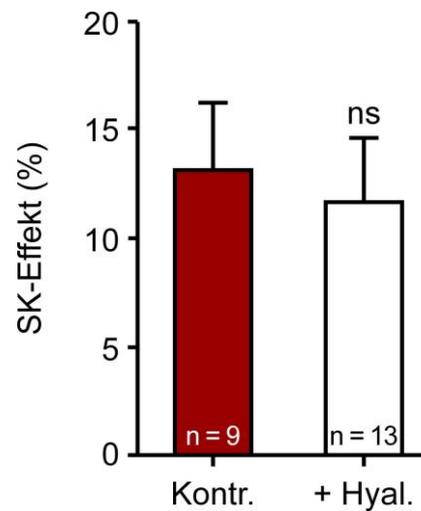


Abb. 39: Inkubation in Hyaluronidase beeinflusste den SK-Effekt des $\alpha\beta$ ENaC nicht

Statistischer Vergleich des SK-Effektes an Kontroll-Oozyten mit unbehandelter Extrazellulärer Matrix (Kontr.), bzw. nach Inkubation der Oozyten in Hyaluronidase (+ Hyal.). ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$.

Wurden jedoch Oozyten zunächst devitellinisiert und zusätzlich in Hyaluronidase inkubiert, zeigte sich eine deutliche und signifikante Reduktion des SK-Effektes von 48 ± 13 ($n = 9$; $N = 3$) unter Kontrollbedingungen auf $8 \pm 13\%$ ($n = 8$; $N = 3$; $p \leq 0,05$) nach Degradation der Extrazellulären Matrix (siehe Abb. 40).

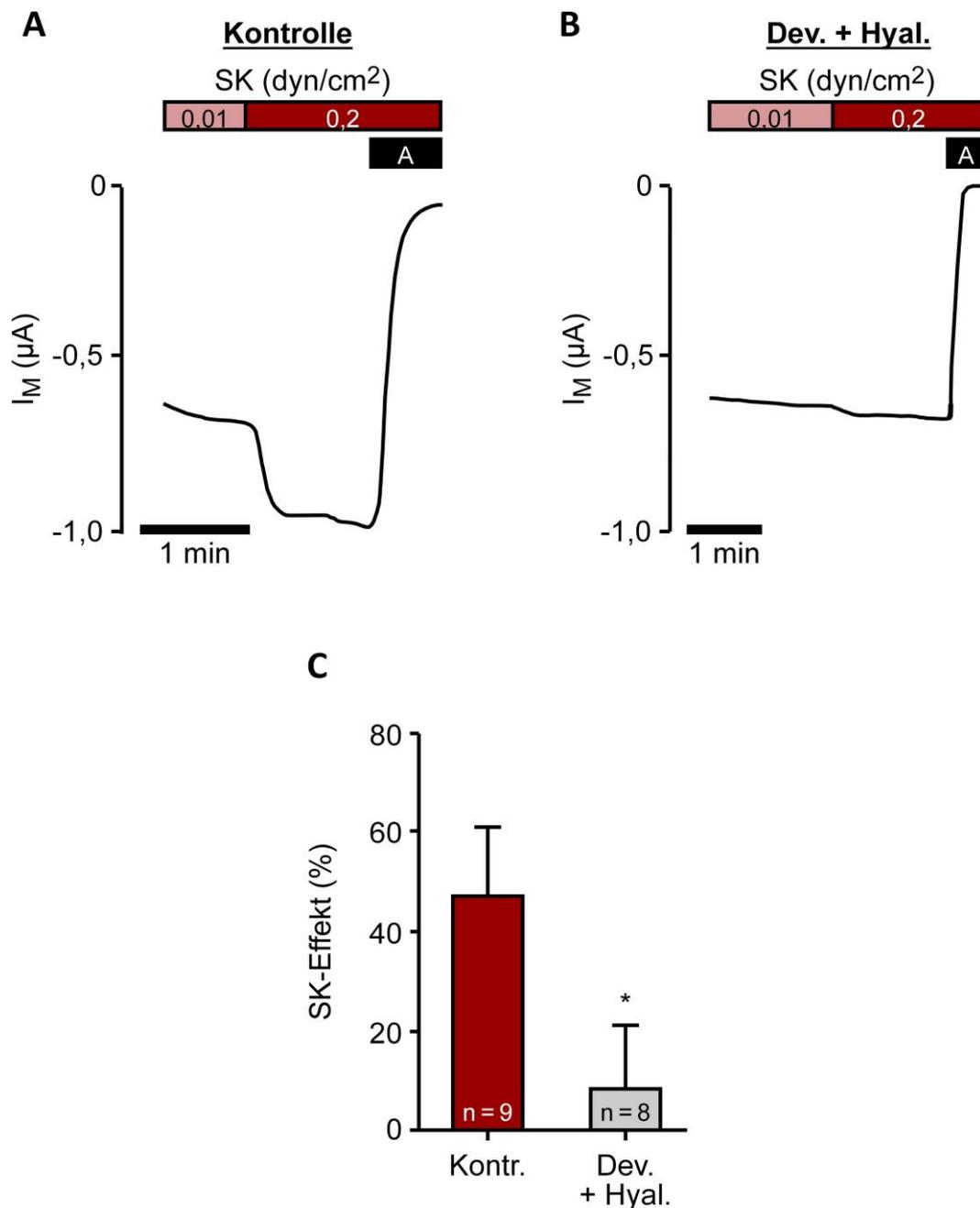


Abb. 40: Der Abbau von Komponenten der Extrazellulären Matrix durch Hyaluronidase reduzierte den SK-Effekt devitelinierter Oozyten

A Stromspur einer ENaC-exprimierenden Oozyte mit intakter Extrazellulärer Matrix. Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit und damit der einwirkenden Scherkräfte von 0,01 auf 0,2 dyn/cm² resultierte in einem raschen Stromanstieg. Amilorid (A) diente der Bestimmung des ENaC-vermittelten Stromes. **B** Devitelinierte Oozyten, die zusätzlich mit Hyaluronidase inkubiert wurden (Dev. + Hyal.), zeigten einen deutlich reduzierten SK-Effekt. **C** Statistische Auswertung des SK-Effekts unter Kontrollbedingungen (Kontr.; unbehandelte Extrazelluläre Matrix) und nach Devitelinisierung mit anschließender Hyaluronidase-Inkubation. *: $p \leq 0,05$.

Diese Ergebnisse lieferten einen Hinweis darauf, dass die Extrazelluläre Matrix – zumindest in *Xenopus* Oozyten – an der Wahrnehmung und Übertragung mechanischer Reize auf den $\alpha\beta\gamma$ ENaC beteiligt ist, da bei der Degradierung von Komponenten der Extrazellulären Matrix das Ausmaß der durch SK induzierten ENaC-Aktivierung deutlich reduziert war.

3.1.3 Die Komponenten der Extrazellulären Matrix beeinflussen den SK-Effekt des $\delta\beta\gamma$ ENaC nicht

Bei einer Wiederholung der oben beschriebenen Inkubationsexperimente mit Oozyten, welche den humanen $\delta\beta\gamma$ ENaC ($\delta 1$ und $\delta 2$) exprimierten, zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zum $\alpha\beta\gamma$ ENaC. Obwohl demselben Versuchsprotokoll unterzogen, wurde der SK-Effekt bei Oozyten, welche den humanen $\delta\beta\gamma$ ENaC exprimierten, durch das Degradieren der Extrazellulären Matrix (*via* Devitellinisierung und zusätzlicher Hyaluronidase-Inkubation) im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinträchtigt (vgl. Abb. 41).

Beim $\delta 1\beta\gamma$ ENaC betrug der SK-Effekt bei intakter Extrazellulärer Matrix (Kontrolle) $23 \pm 8 \%$ ($n = 6$; $N = 2$) und nach Devitellinisierung und Hyaluronidase-Inkubation $28 \pm 9 \%$ ($n = 6$; $N = 2$; $p = 0,2$). Der SK-Effekt des $\delta 2\beta\gamma$ ENaC betrug unter Kontrollbedingungen $21 \pm 8 \%$ ($n = 6$; $N = 2$) und nach Degradierung der Extrazellulären Matrix $25 \pm 8 \%$ ($n = 6$; $N = 2$; $p = 0,8$).

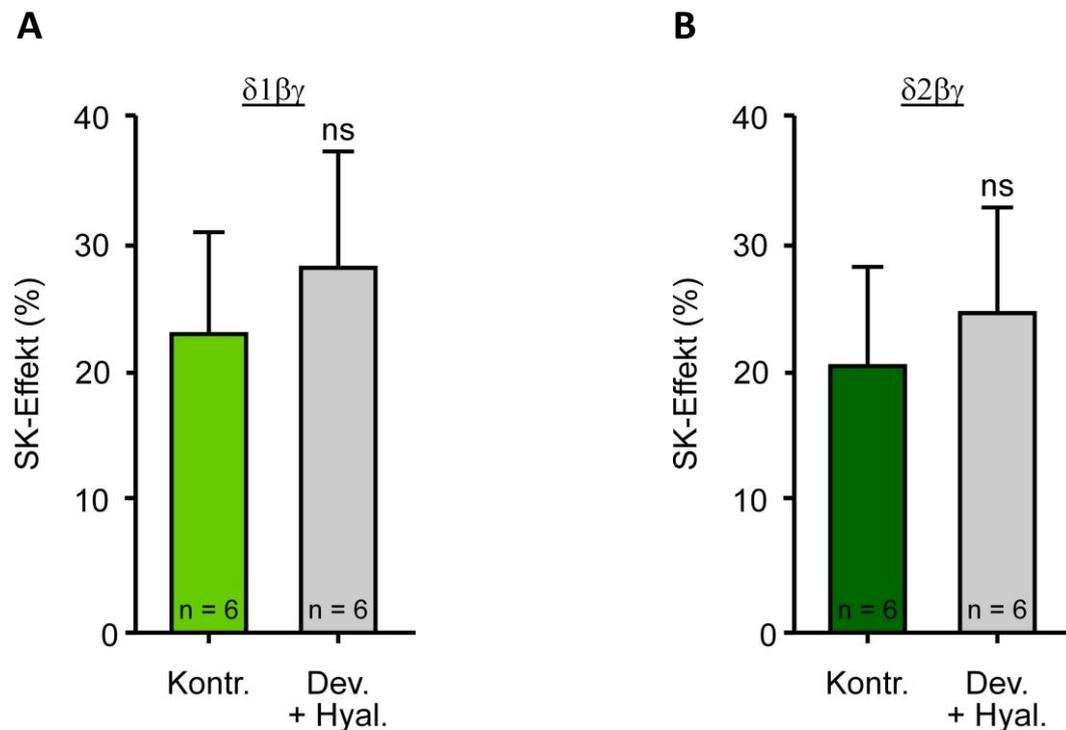


Abb. 41: Die Degradierung der Extrazellulären Matrix reduzierte den SK-Effekt des $\delta\beta\gamma$ ENaC nicht

A, B Der SK-Effekt der beiden $\delta\beta\gamma$ ENaC-Isoformen ($\delta 1$ und $\delta 2$) blieb vom Entfernen der Extrazellulären Matrix durch Devitellinisierung und zusätzliche Inkubation der Oozyten in Hyaluronidase (Dev. + Hyal.) unbeeinflusst. Als Kontrolle diente jeweils der SK-Effekt an unbehandelten Kontroll-Oozyten desselben Donors. ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass vermutlich unterschiedliche Mechanismen existieren, durch die der $\alpha\beta\gamma$ - und der $\delta\beta\gamma$ ENaC durch SK aktiviert werden. Des Weiteren lässt sich schlussfolgern, dass die α -Untereinheit (beim $\alpha\beta\gamma$ ENaC), bzw. die δ -Untereinheit (beim $\delta 1$ - und $\delta 2\beta\gamma$ ENaC) maßgeblich in die SK-Detektion involviert ist. Diese Annahme basiert auf

der Tatsache, dass bei beiden Kanälen die β - und γ -Untereinheit jeweils identisch ist – die Reaktion auf SK bei Degradierung der Extrazellulären Matrix jedoch essentielle Unterschiede aufweist.

3.2 Akuter Effekt von Hyaluronidase auf den ENaC

3.2.1 $\alpha\beta\gamma$ ENaC

Basierend auf der Tatsache, dass das Entfernen von Komponenten der Extrazellulären Matrix den SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC signifikant reduzierte, wurde die folgende Hypothese formuliert: Die Extrazelluläre Domäne der α -Untereinheit könnte mit der Extrazellulären Matrix verknüpft sein (vgl. Abb. 42A). Bei einer Auslenkung der Extrazellulären Matrix durch Scherkräfte würde der mechanische Stimulus auf den ENaC übertragen. Die Folge könnte eine Konformationsänderung und damit eine Aktivitätserhöhung durch einen vermehrten Na^+ -Einstrom sein (vgl. Abb. 42A, B).

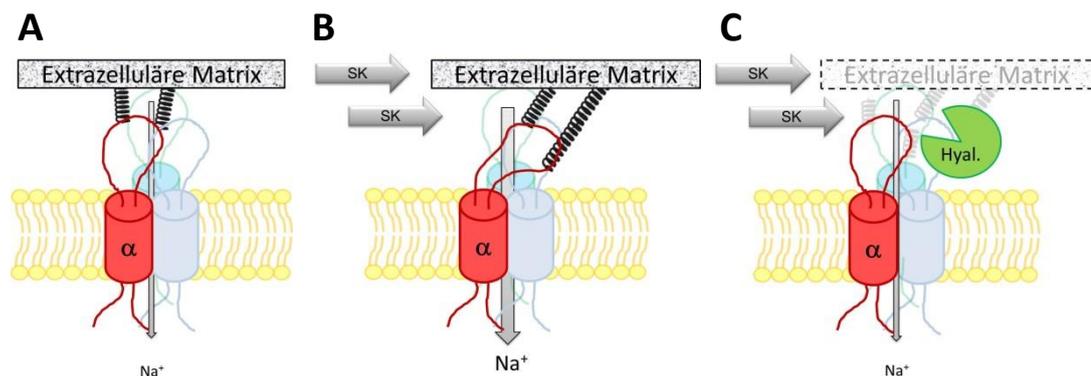


Abb. 42: Hypothetisches Modell zur Wahrnehmung und Übertragung von Scherkraft

A Die Extrazelluläre Domäne der α -Untereinheit des $\alpha\beta\gamma$ ENaC könnte mit der darüber liegenden Extrazellulären Matrix verknüpft sein. **B** Das Auftreten von Scherkräften (SK) führt zu einer Auslenkung der Extrazellulären Matrix. Über die Verknüpfung zum ENaC könnte die Übertragung dieser mechanischen Stimuli auf den Kanal erfolgen, so dass die Extrazelluläre Domäne ebenfalls ausgelenkt würde. Diese Konformationsänderung des ENaC wiederum könnte einen verstärkten Na^+ -Einstrom bedingen. **C** Bei Degradierung der Extrazellulären Matrix durch das Enzym Hyaluronidase (Hyal.) wird entweder die Matrix selbst, oder aber die Verbindung zu ihr zerstört, so dass die Kraftübertragung auf den Kanal unterbunden wäre. Der ENaC wäre folglich nicht mehr in der Lage, SK wahrzunehmen, so dass eine Reduktion seiner Aktivität die Folge wäre.

Sollte dieses Modell zutreffen, dann müsste die Zugabe von Hyaluronidase auf ENaC-exprimierende Oozyten – und damit der Abbau der Extrazellulären Matrix – trotz unveränderter Scherkräfte zu einer unmittelbaren Abnahme des ENaC-vermittelten Stromes führen. Diese Hypothese basiert auf der Annahme, dass bei einer Degradierung der Extrazellulären Matrix die mechanisch vermittelte Aktivierung des Kanals entfällt und der ENaC dadurch in seiner Aktivität gehemmt würde (vgl. Abb. 42C).

Um diese Hypothese zu überprüfen, beschäftigten sich weitere Experimente mit der Fragestellung, ob Hyaluronidase auch akut 1) den Stromverlauf, sowie 2) die Höhe des SK-Effektes zu beeinflussen vermag. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde Hyaluronidase (300 U/ml) in Oozyten-Ringerlösung (ORi) gelöst und unter dem Einfluss von Scherkräften ($0,2 \text{ dyn/cm}^2$) für 2 min auf $\alpha\beta\gamma$ ENaC-exprimierende Oozyten appliziert. Vor Zugabe des Enzyms wurde der pH-Wert der Badlösung auf pH 6 reduziert, um optimale Bedingungen für das Enzym zu generieren.

Wie aus Abb. 43B und C ersichtlich, führte die Zugabe von Hyaluronidase zu einer unmittelbaren Abnahme des ΔI_{ENaC} um $44 \pm 9 \%$ ($n = 7$; $N = 2$). In Kontroll-Messungen wurde statt der Hyaluronidase lediglich für 2 min mit ORi perfundiert, was den Stromverlauf nicht beeinflusste (Abb. 43A). Anschließend wurde sowohl bei der Kontroll-Messung (ohne Hyaluronidase), als auch in Anwesenheit des Enzyms die Perfusion ausgeschaltet und damit die einwirkende Scherkraft entfernt (0 dyn/cm^2). Wie aus Abb. 43B ersichtlich, beeinflusste das Entfernen der Scherkraft in Gegenwart von Hyaluronidase den Stromverlauf nicht. Das Stoppen der Perfusion (- SK) unter Kontrollbedingungen (ohne Hyaluronidase) hingegen resultierte in einer Inhibition des ΔI_{ENaC} um $48,8 \pm 8 \%$ ($n = 6$; $N = 2$), welche die durch Hyaluronidase induzierte Hemmung imitierte ($p \geq 0,05$; vgl. Abb. 43C). Abschließend wurde Scherkraft ($0,2 \text{ dyn/cm}^2$) in An- und Abwesenheit von Hyaluronidase appliziert und der dadurch hervorgerufene SK-Effekt bestimmt. Wie aus Abb. 43D ersichtlich, war der SK-Effekt unter dem Einfluss von Hyaluronidase (SK-Effekt: $57 \pm 11 \%$; $n = 7$; $N = 2$) geringer als unter Kontrollbedingungen (ohne Hyaluronidase; SK-Effekt: $175 \pm 44 \%$; $n = 6$; $N = 2$; $p \leq 0,05$).

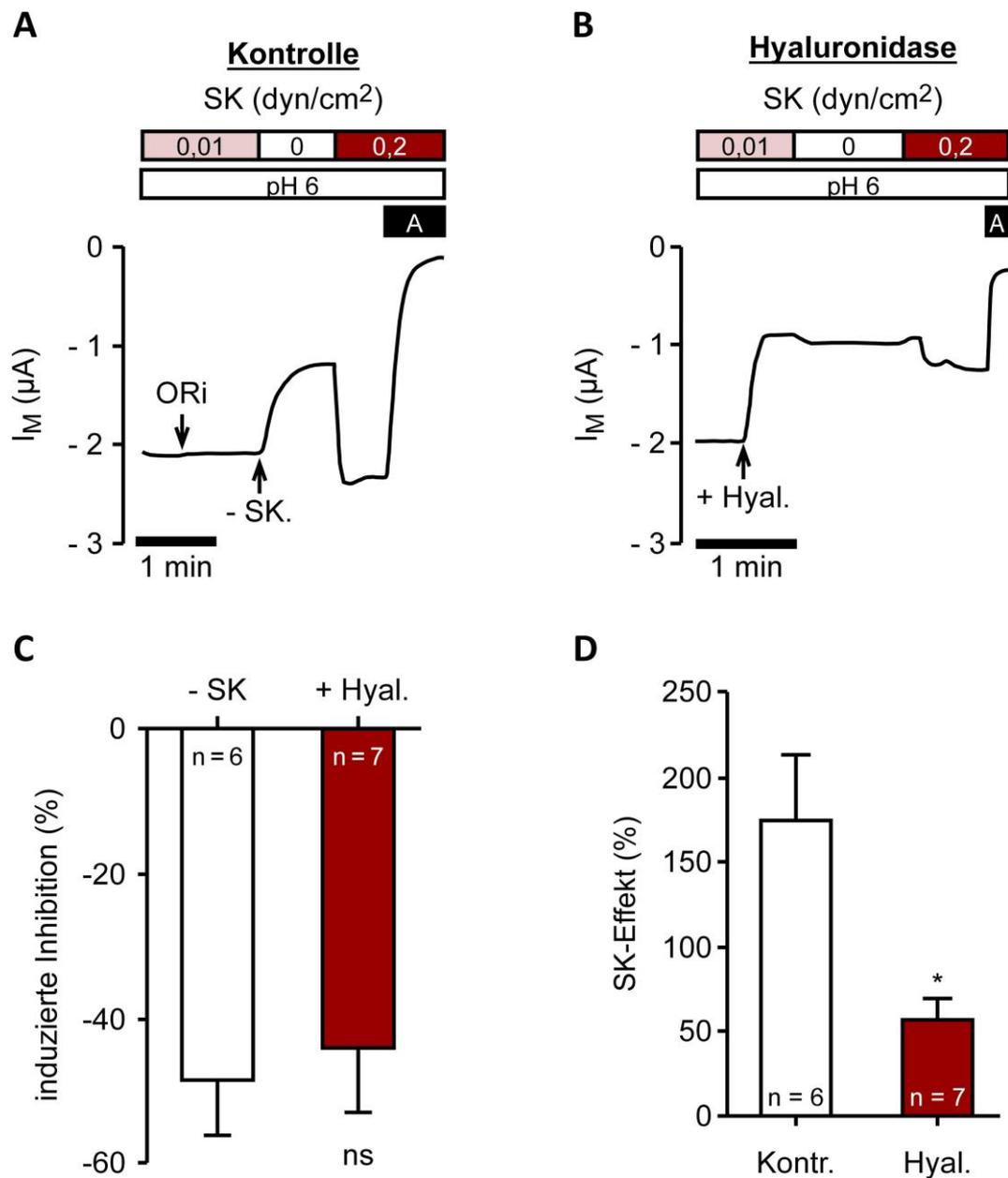


Abb. 43: Hyaluronidase reduzierte den SK-Effekt des $\alpha\beta$ ENaC

A Kontroll-Experiment zur Bestimmung des SK-Effektes in Abwesenheit von Hyaluronidase. Anstatt Hyaluronidase wurde bei geringen Scherkräften (0,01 dyn/cm²) kontinuierlich mit Oozyten-Ringer-Lösung (ORi) perfundiert. Das Stoppen der Perfusion (0, - SK) führte zu einem unmittelbaren Abfall des I_M. Darauf folgende Applikation von SK (0,2 dyn/cm²) induzierte einen rapiden Stromanstieg. Amilorid (10 μM, A) wurde zum Abschluss jeder Messung appliziert, um den ENaC-vermittelten Strom (ΔI_{ENaC}) zu bestimmen. **B** Bestimmung des SK-Effektes unter dem Einfluss von Hyaluronidase (300 U/ml). Diese wurde zunächst mit geringer Geschwindigkeit für 2 min appliziert (+ Hyal.), was zu einer Hemmung des transmembranen Stromes (I_M) führte. Das Stoppen der Perfusion und damit das Entfernen der Scherkraft (0 dyn/cm²) beeinflusste den Stromverlauf nicht. Das darauffolgende Starten der Perfusion mit höherer Geschwindigkeit (+ SK; 0,2 dyn/cm²) verursachte einen geringen SK-Effekt. **C** Die durch das Stoppen der Perfusion (- SK) induzierte prozentuale Hemmung des ΔI_{ENaC} der Kontroll-Experimente unterschied sich nicht signifikant von der durch Hyaluronidase induzierten Inhibition (+ Hyal.). ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$. **D** Der SK-Effekt unter Hyaluronidase (Hyal.) war signifikant geringer (*: $p \leq 0,05$) als unter Kontrollbedingungen (ohne Hyaluronidase; Kontr.).

Zur Verifizierung, dass es sich bei der durch Hyaluronidase verursachten Hemmung um einen ENaC-vermittelten Effekt handelte, wurde Hyaluronidase (300 U/ml) auf Wasser-injizierte Kontroll-Oozyten appliziert (vgl. Abb. 44). Dies führte zu einem reversiblen Anstieg des transmembranen Stromes (I_M) von vorher $-33,3 \pm 5,8$ nA auf $-53,0 \pm 5,6$ nA ($n = 4$; $N = 2$; $p \leq 0,01$). Dass Hyaluronidase an Kontroll-Oozyten keine Abnahme des I_M verursachte, impliziert, dass es sich bei dem Stromabfall an $\alpha\beta\gamma$ ENaC-exprimierenden Oozyten um einen ENaC-vermittelten Effekt handelte.

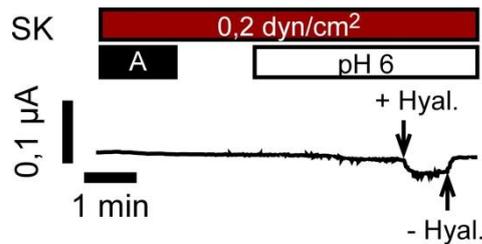


Abb. 44: Der Einfluss von Hyaluronidase auf Wasser-injizierte Kontroll-Oozyten

Hyaluronidase (+ Hyal.) induzierte bei Wasser-injizierten Kontroll-Oozyten einen geringen und reversiblen (- Hyal.) Anstieg des transmembranen Stromes (I_M).

Die akut durch Hyaluronidase induzierte Stromabnahme, welche den Verlust der mechanischen Aktivierung imitierte (-SK; vgl. Abb. 43C), untermauerte in Kombination mit dem unter Hyaluronidase reduzierten SK-Effekt (Abb. 43D) die Hypothese, dass die SK-Wahrnehmung und die darauf folgende Übertragung auf den $\alpha\beta\gamma$ ENaC über eine Verbindung zur Extrazellulären Matrix erfolgt.

Zur weiteren Überprüfung dieser Annahme wurde zusätzlich die Applikationsreihenfolge umgekehrt. Falls Hyaluronidase tatsächlich über den Verdau von Komponenten der Extrazellulären Matrix die SK-Wahrnehmung des ENaC vermindert, dann wiederum sollte das Enzym in Abwesenheit von SK keinen Einfluss auf die Kanal-Aktivität nehmen können. Zu diesem Zweck wurden ENaC-exprimierende Oozyten zunächst Scherkräften in Höhe von $0,2$ dyn/cm² ausgesetzt. Der ΔI_{ENaC} betrug unter diesen Bedingungen $0,8 \pm 0,2$ μA ($n = 5$; $N = 2$). Das Stoppen der Perfusion führte auf Grund des Fehlens der mechanischen Aktivierung zu einem Stromabfall auf $0,3 \pm 0,1$ μA ($n = 5$; $N = 2$; $p \leq 0,01$). Hatte sich ein stabiles Stromniveau eingestellt, wurde Hyaluronidase in einer Endkonzentration von 300 U/ml direkt in die Messkammer pipettiert. Dies induzierte einen artifiziellen und transienten Stromanstieg (siehe Abb. 45A), welcher auf den Pipettiervorgang selbst zurückzuführen war – da er auch beobachtet wurde, wenn unter gleichen Bedingungen lediglich ORi in die Messkammer pipettiert wurde (Abb. 45B). Nach Hyaluronidase-Zugabe unterschied sich der ΔI_{ENaC} nicht signifikant von demjenigen vor Zugabe des Enzyms ($0,3 \pm$

0,1 μA ; $n = 5$; $N = 2$; $p = 0,6$; Abb. 45C). Zum Abschluss des Experimentes wurde Amilorid in die Messkammer pipettiert. Dies geschah nicht nur um den ΔI_{ENaC} zu bestimmen, sondern auch um zu prüfen, ob das Hinzupipettieren einer Substanz zu einer effektiven Verteilung der Substanz in der Messkammer führte. Es wäre möglich, dass sich die Substanz durch das Fehlen der Perfusion nicht gleichmäßig in der Messkammer verteilt, so dass die Oozyte – und damit der ENaC – nicht gleichmäßig durch das Pharmakon erreicht würde. Da jedoch die Zugabe von Amilorid zu einer rapiden Abnahme des I_{M} führte (vgl. Abb. 45A), kann davon ausgegangen werden, dass auch das Zufügen von Hyaluronidase zu einer effektiven Verteilung innerhalb der Messkammer und damit erfolgreichen *cleavage* seines Substrates führte.

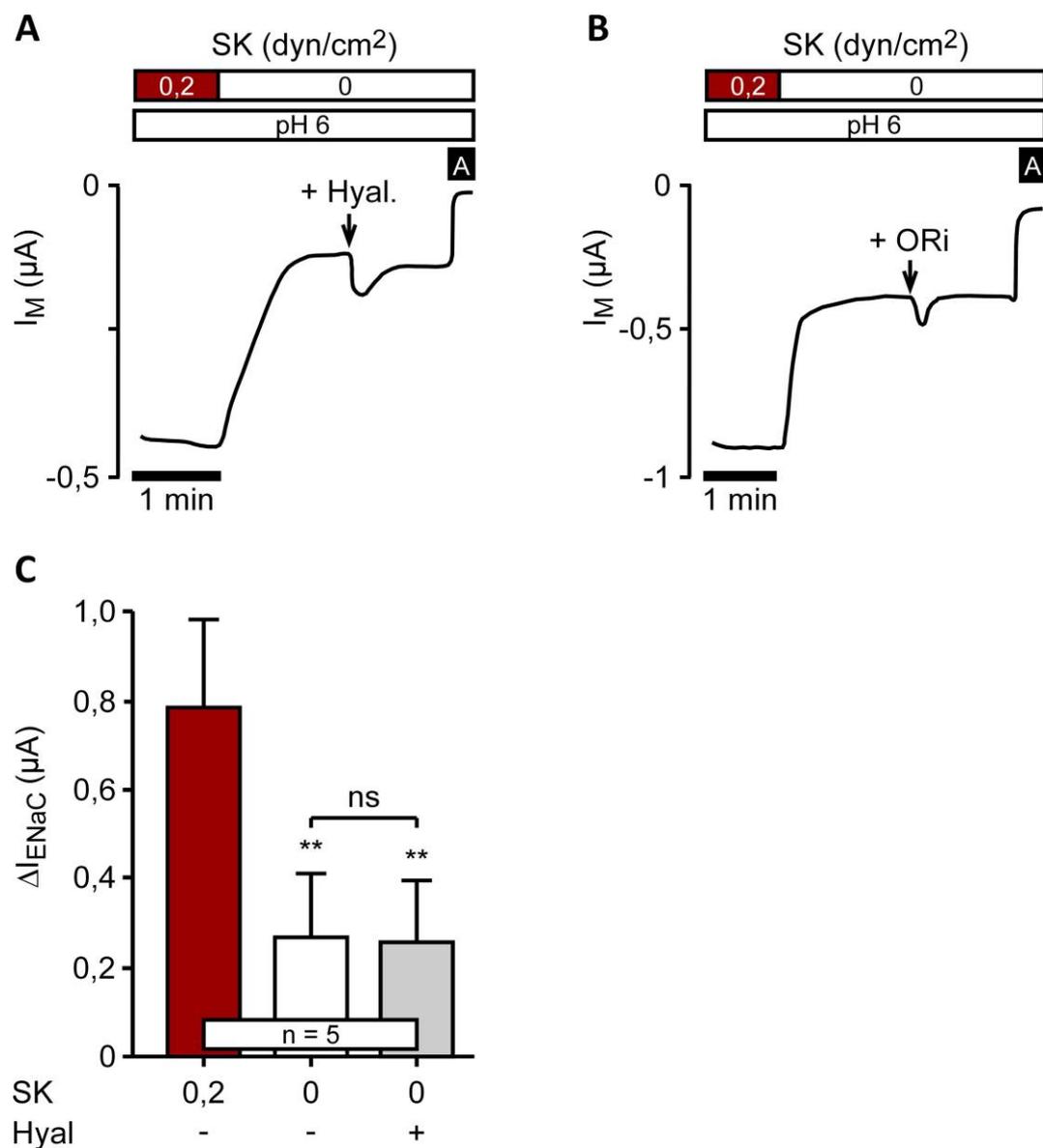


Abb. 45: Der Einfluss von Hyaluronidase auf den $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ in Abwesenheit von Scherkraft

A Stromspur einer $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ -exprimierenden Oozyte. Das Entfernen der einwirkenden Scherkraft (SK; 0,2 \rightarrow 0 dyn/cm²) induzierte eine unmittelbare Reduktion des transmembranen Stromes (I_{M}). Das Hinzupipettieren von Hyaluronidase (+ Hyal.) führte zu einem transienten und artifiziellen Stromanstieg, der auch beobachtet wurde, wenn lediglich Oozyten-Ringer (ORi) in die Messkammer pipettiert wurde (**B**). **C** In Abwesenheit von Scherkraft (0) beeinflusste Hyaluronidase (+ Hyal.) den Stromverlauf nicht. Die Signifikanzniveaus beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf den Wert unter Scherkraft (+ SK). ns: $p \geq 0,05$; **: $p \leq 0,01$.

Da Hyaluronidase bei fehlender SK keinen Einfluss auf die Aktivität $\alpha\beta\gamma$ ENaC-exprimierender Oozyten nimmt, lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass das Enzym tatsächlich über die Degradierung von Komponenten der Extrazellulären Matrix und damit dem Trennen einer Verbindung zwischen ENaC und der Extrazellulären Matrix die SK-Wahrnehmung des Kanals beeinflusst.

3.2.2 $\delta\beta\gamma$ ENaC

Identische Versuche zur akuten Wirkung des Enzyms Hyaluronidase wurden auch an $\delta 1$ -, bzw. $\delta 2\beta\gamma$ ENaC-exprimierenden Oozyten durchgeführt. Sollte die zuvor aufgestellte Hypothese zutreffend sein, dass für den $\delta\beta\gamma$ ENaC ein alternativer Mechanismus zur SK-Detektion existiert, dann sollte die Anwesenheit des die Extrazelluläre Matrix degradierenden Enzyms Hyaluronidase weder den ENaC-vermittelten Strom, noch den SK-Effekt $\delta\beta\gamma$ ENaC-exprimierender Oozyten beeinflussen.

Um dies zu überprüfen, wurde Hyaluronidase (300 U/ml) unter einwirkender SK ($0,01 \text{ dyn/cm}^2$) auf $\delta\beta\gamma$ ENaC-exprimierende Oozyten appliziert. Hier zeigte sich – konträr zu den am $\alpha\beta\gamma$ ENaC gewonnenen Daten – dass Hyaluronidase den Stromverlauf nicht zu beeinflussen vermochte (vgl. Abb. 46B). Beim $\delta 1\beta\gamma$ ENaC betrug der ΔI_{ENaC} vor Hyaluronidase $1,31 \pm 0,4 \mu\text{A}$ und unter dem Einfluss des Enzyms $1,29 \pm 0,3 \mu\text{A}$ ($n = 11$; $N = 3$; $p = 0,9$). Auch für den $\delta 2\beta\gamma$ ENaC zeigte sich keine signifikante Beeinflussung des ΔI_{ENaC} durch die Zugabe der Hyaluronidase (vor Hyal.: $0,85 \pm 0,2 \mu\text{A}$; nach Hyal.: $0,83 \pm 0,2 \mu\text{A}$; $n = 12$; $N = 3$; $p = 0,9$).

Zur Bestimmung des SK-Effektes wurde zunächst die Perfusion ausgeschaltet. Dies induzierte sowohl unter Kontrollbedingungen, als auch in Anwesenheit von Hyaluronidase eine durch den Wegfall der mechanischen Aktivierung (0 dyn/cm^2) bedingte Stromabnahme (vgl. Abb. 46A, B). Durch anschließende Applikation von SK ($0,2 \text{ dyn/cm}^2$) wurde der SK-Effekt bestimmt.

Es zeigte sich, dass der SK-Effekt beider $\delta\beta\gamma$ ENaC-Isoformen durch die Anwesenheit des Matrix-degradierenden Enzyms Hyaluronidase nicht beeinflusst wurde. Beim $\delta 1\beta\gamma$ ENaC betrug die durch SK-induzierte Aktivierung unter Kontrollbedingungen $81 \pm 31 \%$ ($n = 9$; $N = 3$) und unterschied sich damit nicht von derjenigen unter dem Einfluss von Hyaluronidase mit $80 \pm 31 \%$ ($n = 8$; $N = 3$; $p = 0,9$; Abb. 46C).

Ebenso verhielt es sich für den $\delta 2\beta\gamma$ ENaC, dessen Aktivität durch SK unter Kontrollbedingungen um $88 \pm 28 \%$ ($n = 9$; $N = 3$) erhöht wurde. In Anwesenheit des Enzyms Hyaluronidase betrug der SK-Effekt $78 \pm 33 \%$, und unterschied sich damit ebenfalls nicht von der Kontrolle ($n = 9$; $N = 3$; $p = 0,9$; vgl. Abb. 46D).

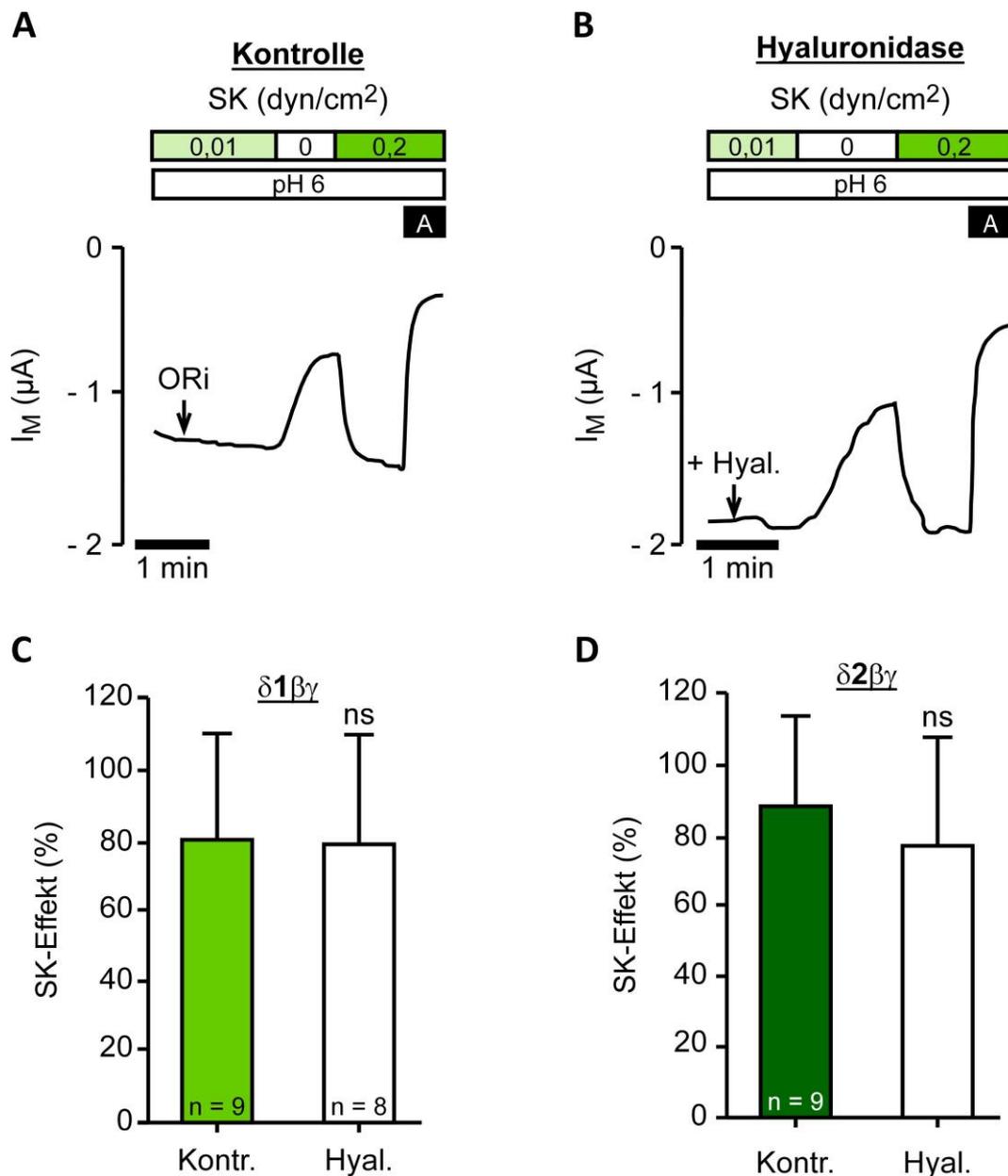


Abb. 46: Hyaluronidase beeinflusste den SK-Effekt des $\delta\beta\gamma$ ENaC nicht

A Kontroll-Messung an einer $\delta 1\beta\gamma$ ENaC-exprimierenden Oozyte zur Bestimmung des SK-Effektes in Abwesenheit von Hyaluronidase. Statt des Enzyms wurde Oozyten-Ringer (ORi) bei einem pH-Wert von 6 und Scherkräften von 0,01 dyn/cm² appliziert. Der SK-Effekt wurde nach dem Stoppen der Perfusion (0) durch Applikation von SK (0,2 dyn/cm²) hervorgerufen. Amilorid (A, 100 μ M) wurde am Ende der Messung appliziert, um den ΔI_{ENaC} zu bestimmen. **B** Bestimmung des SK-Effektes in Gegenwart von Hyaluronidase (300 U/ml). **C** Der SK-Effekt wurde weder beim $\delta 1$ -, noch beim $\delta 2\beta\gamma$ ENaC (**D**) durch die Anwesenheit des Enzyms Hyaluronidase (Hyal.) im Vergleich zur Kontrolle (Kontr., ohne Hyaluronidase) beeinflusst. ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$.

Die Tatsache, dass weder der ΔI_{ENaC} noch der SK-Effekt der $\delta\beta\gamma$ ENaC-Isoformen ($\delta 1$ bzw. $\delta 2$) akut durch Hyaluronidase beeinflusst wurde, festigte die aufgestellte Hypothese, dass der molekulare Mechanismus der SK-Detektion zwischen $\alpha\beta\gamma$ - und $\delta\beta\gamma$ ENaC nicht konserviert ist, bzw. alternative Mechanismen für die beiden Kanaltypen existieren.

4 Verknüpfungsstellen zwischen $\alpha\beta\gamma$ ENaC und Extrazellulärer Matrix

Die vorliegenden Daten – sowohl an Oozyten, deren Extrazelluläre Matrix verdaut wurde (vgl. Abschnitt 4.1), als auch diejenigen, welche unter dem akuten Einfluss von Hyaluronidase gewonnen wurden (vgl. Abschnitt 4.2) – legen den Schluss nahe, dass zumindest der $\alpha\beta\gamma$ ENaC mit der Extrazellulären Matrix verknüpft ist und dass diese Verknüpfung für dessen Mechanosensitivität essentiell ist. Bei beiden bisher untersuchten Kanaltypen ($\alpha\beta\gamma$ und $\delta\beta\gamma$) waren die β - und γ -Untereinheit jeweils identisch. Jedoch kam es sowohl bezüglich der mechanischen Aktivierung des ENaC bei Verdau der Extrazellulären Matrix, als auch beim akuten Effekt der Hyaluronidase zu völlig gegensätzlichen Ergebnissen. Deshalb lag der Schluss nahe, dass eventuelle Verknüpfungsstellen zwischen den Extrazellulären Domänen und der Extrazellulären Matrix in der α -Untereinheit lokalisiert sein müssten. Die darauffolgenden Experimente waren daher der Absicht gewidmet, die Verknüpfungsstellen zwischen den Extrazellulären Domänen der α -Untereinheit und der Extrazellulären Matrix zu identifizieren.

Potentielle Anknüpfungsstellen zwischen Proteinen und Zuckermolekülen der Extrazellulären Matrix sind Asparagine, die über ihr Stickstoffatom eine N-Glykosylierung ausbilden können (siehe Abb. 47).

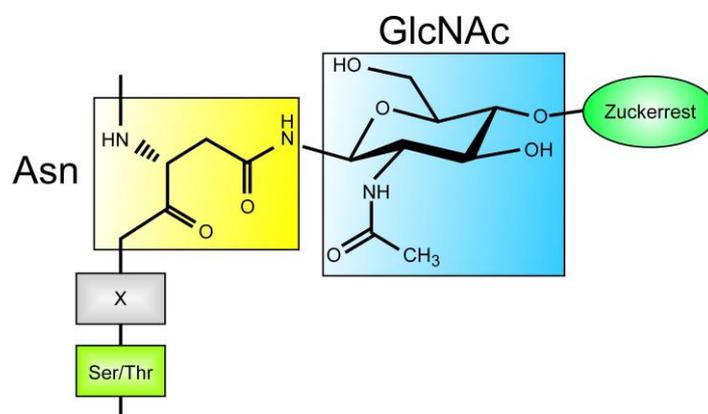


Abb. 47: Schematische Darstellung der N-Glykosylierung eines Asparagins

Asparagine (Asn, gelb), die innerhalb einer bestimmten Konsensussequenz vorliegen, können über ihr Stickstoffatom (N) eine N-glykosidische Bindung zu N-Acetylglucosaminen (GlcNAc) der Extrazellulären Matrix aufbauen. Die Konsensussequenz umfasst Asparagin (Asn) an erster Stelle, gefolgt von einer beliebigen darauffolgenden Aminosäure mit Ausnahme von Prolin (X) und beinhaltet Serin oder Threonin (Ser/Thr) an dritter Stelle.

Im Jahre 1994 publizierten sowohl Canessa *et al.*, als auch Snyder *et al.*, dass in der α -Untereinheit des Ratten-ENaC sechs Asparagine glykosyliert vorliegen (Canessa *et al.* 1994; Snyder *et al.* 1994). Basierend auf diesem Befund wurde daraufhin mittels eines

Sequenzabgleichs (*Sequence-Alignment*) nachgewiesen, dass fünf von diesen Asparaginen auch beim humanen α -ENaC konserviert sind (vgl. Abb. 48).

Ratte	MMLDHTRAPELNIDLDLHASNSPKGSMKGNQFKEQDPCPPQPMQGLGKGDKREEQGLGPE	60
Human	-----MEGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREEQGLGPE	34
Ratte	PSAPRQPTEEEALIEFHRSYRELFFCNNTTIHGAI RLVCSKHNRMKTAFWAVLWLCT	120
Human	PAAPQQPTAEEALIEFHRSYRELFEFFCNNTTIHGAI RLVCSQHNRMKTAFWAVLWLCT	94
Ratte	FGMMYWQFALLFEEYLSYPVSLNINLNSDKLVFPAVTVCTLNYPYRTEIKEELEELDRIT	180
Human	FGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLNINLNSDKLVFPAVTICTLNYPYRPEIKEELEELDRIT	154
Ratte	EQTLFDLYKYNSSTRQAGARRSSRDLLGAFPHPLQRLRTPPPPYSGRTARSGSSSVRD	240
Human	EQTLFDLYKYSSFTTLVAGRSR-RDLRGTLPHPLQRLRVPPPHGARRARSVASSLRD	212
Ratte	NNPQVDRKDWKIGFQLCNQNKSDCFYQTYSSGVDVAVREWYRFHYINILSRLSDTSPALEE	300
Human	NNPQVDKDWKIGFQLCNQNKSDCFYQTYSSGVDVAVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEE	272
Ratte	EALGNFI FT CRFNQAPCNQANYSKFHHPMYGNCYTFNDKNNNSNLWMSMPPGVNGLSLTL	360
Human	DTLGNFI FACRFNQVSCNQANYSHFHHPMYGNCYTFNDKNNNSNLWMSMPPGINNGLSLML	332
Ratte	RTEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEPAFMDDGGFNLRPGVETSI SMRKEALDSLGGNYG	420
Human	RAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQDEPAFMDDGGFNLRPGVETSI SMRKETLDRGGDYG	392
Ratte	DCTENGS DVPVKNLYPSKYTQQVCIHSCFQENMIKCGCAYIFYPKPKGVFCDYRKQSS	480
Human	DCTKNGSDVPVENLYPSKYTQQVCIHSCFQESMIKCGCAYIFYPRQNVVEYCDYRKHSS	452
Ratte	WGYCYKLGAFSLDSLGCFSKCRKPCSVINYKLSAGYSRWPSVKSQDWIFEMLSLQNNY	540
Human	WGYCYKLGQVDFSSDHLGCFTKCRKPCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFMLSRQNNY	512
Ratte	TINNRKNGVAKLNIFFKELNYKTNSESPSVTMVLSLNLGSQWSLWFGS SVLSVVEMAEL	600
Human	TVNNRNGVAKVNIFFKELNYKTNSESPSVTMVTLNLGSQWSLWFGS SVLSVVEMAEL	572
Ratte	IFDLLVITLLMLLRRFRSRYWSPGRGARGAREVASTPASSFPSRFPHTSPPPSLPQQG	660
Human	VFDLLVIMFLMLLRRFRSRYWSPGRGARGAREVASTLASSPPSHFCPHMS-LSLSQPG	630
Ratte	MTPPLALTAPPAYATLGPSAPPLDSAAPDCSACALAAL	699
Human	PAPSPALTAPPAYATLGPRPSPGGSAGASSSTCPLGGP	669

Abb. 48: Sequence-Alignment zwischen dem humanem α ENaC und dem α ENaC der Ratte

Fünf Asparagine (N, rot hinterlegt) innerhalb der Extrazellulären Domäne der α ENaC-Untereinheit, deren Glykosylierung für den Ratten-ENaC bereits nachgewiesen wurde (Canessa 1994; Snyder et al. 1994) sind zwischen Ratte (*NCBI Reference Sequence*: NP_113736.1) und dem humanen α ENaC (*NCBI Reference Sequence*: NP_001029.1) konserviert. Die beiden Transmembrandomänen sind in grau hinterlegt, der dazwischen liegende Bereich repräsentiert die Extrazelluläre Domäne.

Die mutmaßlich glykosylierten Asparagine des α ENaC befinden sich an den Positionen 232, 293, 312, 397 und 511. Mittels zielgerichteter Punktmutation wurden sie jeweils durch ein Alanin substituiert. Da Alanin auf Grund des fehlenden Stickstoff-Atoms deglykosyliert vorliegt, sollte dadurch die Verbindung zur Extrazellulären Matrix an dieser Stelle nicht mehr vorhanden sein.

Für den Fall, dass die für die Wahrnehmung von SK essentielle Verbindung zur Extrazellulären Matrix über die Glykosylierung eines dieser Asparagine erfolgt, sollte im Umkehrschluss dessen Mutation in einem reduzierten SK-Effekt (im Vergleich zum Wildtyp-ENaC) resultieren. Dies wäre durch die Tatsache begründet, dass die SK-Übertragung auf den Kanal in diesem Falle beeinträchtigt wäre, d.h. die Extrazelluläre Domäne würde (bei gleicher

SK-Rate) nicht im gleichen Maße ausgelenkt wie beim Wildtyp-ENaC. Graphisch veranschaulicht ist diese Hypothese in Abb. 49.

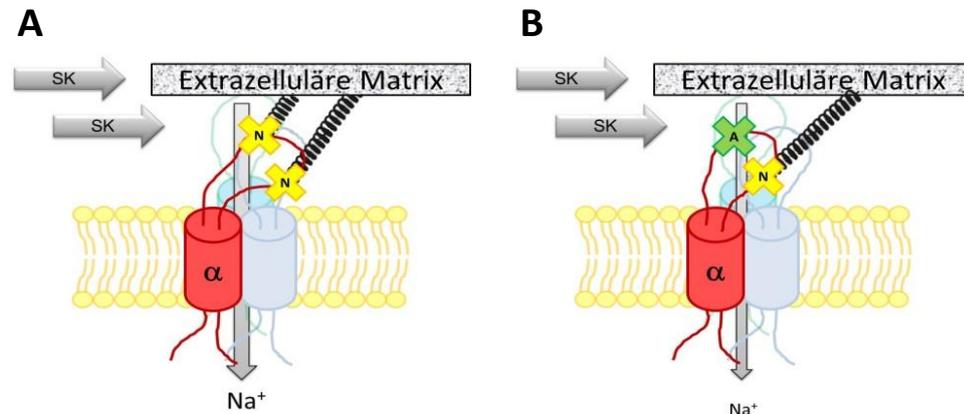


Abb. 49: Hypothetisches Modell zur SK-Übertragung auf den $\alpha\beta$ ENaC bei Mutation einer potentiellen Verbindungsstelle zur Extrazellulären Matrix

A Die Extrazelluläre Domäne der α ENaC-Untereinheit könnte über die Glykosylierung von Asparaginen (N, gelb) mit der darüber liegenden Extrazellulären Matrix verknüpft sein. Eine Scherkraft (SK)-vermittelte Auslenkung der extrazellulären Matrix würde somit in einer Konformationsänderung der Extrazellulären Domäne und damit einer Aktivitätserhöhung des ENaC (Na^+ -Einstrom) resultieren. **B** Bei Mutation eines Asparagins (N) zu einem Alanin (A) würde die Verbindung durch die fehlende Glykosylierung zerstört, so dass die Kraftübertragung auf den Kanal beeinträchtigt wäre. Aus diesem Grund würde die Extrazelluläre Domäne nicht in gleichem Maße ausgelenkt wie beim Wildtyp-ENaC, so dass der SK-Effekt reduziert wäre.

Die Asparagin-Mutanten der α ENaC-Untereinheit wurden jeweils in Kombination mit der Wildtyp- β - und γ -Untereinheit in Oozyten exprimiert. Im Zuge von TEVC-Messungen wurde daraufhin der SK-Effekt der Asparagin-Mutanten bestimmt, indem die Oozyten SK in Höhe von $0,2 \text{ dyn/cm}^2$ ausgesetzt wurden. Der Mittelwert des SK-Effekts der Asparagin-Mutanten wurde anschließend zu demjenigen der zugehörigen Kontrolle (Wildtyp- $\alpha\beta\gamma$ ENaCs, welche in Oozyten desselben Donors exprimiert wurden) ins Verhältnis gesetzt. Der Kontroll-SK-Effekt entsprach daher stets dem Wert $1 \pm \text{SEM}$.

4.1 Charakterisierung der Asparagin-Mutanten

4.1.1 SK-Effekt

Bei der Charakterisierung der Asparagin-Mutanten zeigte sich, dass der SK-Effekt bei denjenigen Kanälen, bei welcher das Asparagin an Stelle 312 oder 511 der α -Untereinheit gegen ein Alanin ausgetauscht wurde ($\alpha\text{N312A}\beta\gamma$, bzw. $\alpha\text{N511A}\beta\gamma$) signifikant geringer war als beim Wildtyp (Wt), während bei den Mutanten $\alpha\text{N232A}\beta\gamma$, $\alpha\text{N293A}\beta\gamma$ und $\alpha\text{N397A}\beta\gamma$ keine signifikante Änderung des SK-Effektes beobachtet werden konnte (siehe Abb. 50).

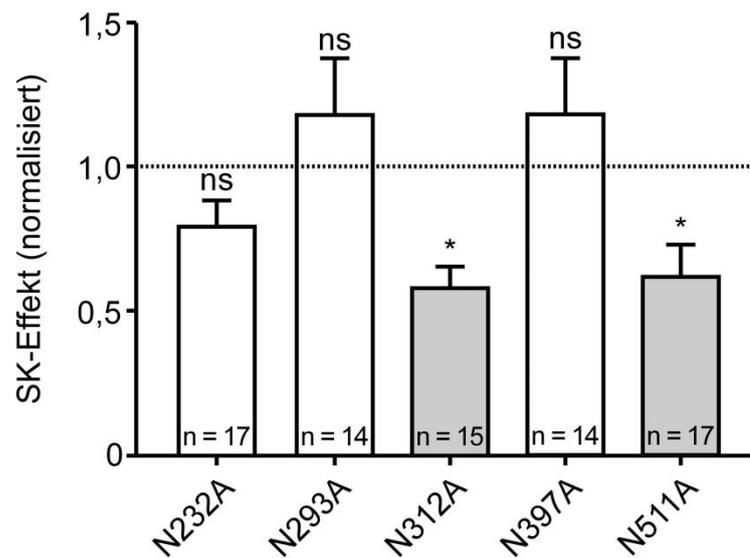


Abb. 50: Die Zielgerichtete Mutagenese der Asparagine 312 oder 511 der α ENaC-Untereinheit reduzierte den SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC

Die Substitution der Asparagine (N) 232, 293 und 397 gegen ein Alanin (A) resultierte in keiner Beeinflussung des SK-Effekts, während die Mutanten, bei denen das Asparagin an Position 312, bzw. 511 substituiert wurden, einen reduzierten SK-Effekt im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen. Die Normalisierung erfolgte, indem jeweils der Mittelwert des SK-Effekts der Asparagin-Mutante zu demjenigen des Wildtyp ENaCs (exprimiert in Oozyten desselben Batches) ins Verhältnis gesetzt wurde ($\text{SK-Effekt}_{(\text{Mut})} / \text{SK-Effekt}_{(\text{wt})}$). Die Signifikanzniveaus ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$ und *: $p \leq 0,05$ beziehen sich jeweils auf den Kontroll-SK-Effekt an Oozyten desselben Donors (gestrichelte Linie).

Diese Befunde lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine potenzielle Verknüpfung zwischen der Extrazellulären Domäne des $\alpha\beta\gamma$ -ENaC und der Extrazellulären Matrix möglicherweise über die Asparagine 312 und 511 in der Extrazellulären Domäne der α ENaC-Untereinheit erfolgt, und dass diese Verknüpfung für die Detektion von auftretenden Scherkräften essentiell ist.

4.1.2 Der Einfluss von Hyaluronidase auf den ΔI_{ENaC} der Asparagin-Mutanten

Zur weiteren Überprüfung der Hypothese, dass die Substitution der mutmaßlich glykosylierten Asparagine eventuell in einer Trennung der Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix resultiert, wurden Experimente durchgeführt, in denen der Effekt von Hyaluronidase auf die Asparagin-Mutanten untersucht wurde. Bei Substitution der Asparagine 312 und 511 der α -Untereinheit sollten diese Kanäle durch die fehlende Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix einen im Vergleich zum Wildtyp reduzierten Effekt auf Hyaluronidase zeigen, während der Hyaluronidase-Effekt bei den Mutanten α N232A $\beta\gamma$, α N293A $\beta\gamma$ und α N397A $\beta\gamma$ nicht beeinträchtigt sein sollte (vgl. Abb. 51).

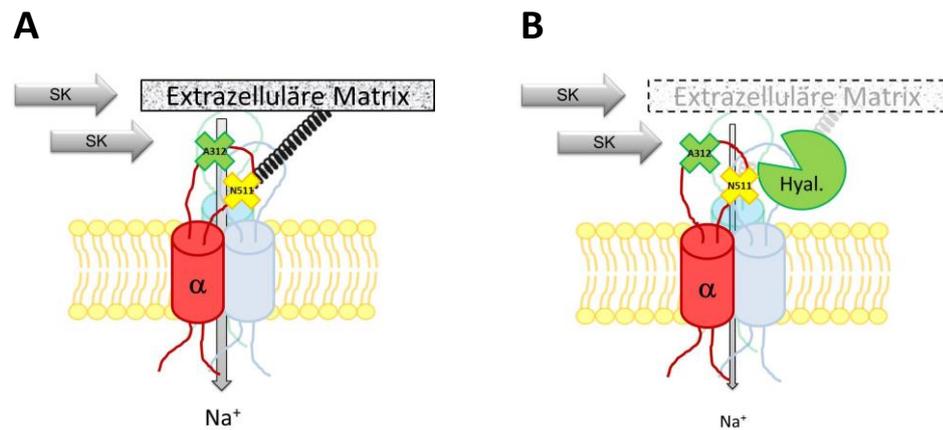


Abb. 51: Hypothetisches Modell zum Effekt von Hyaluronidase auf Asparagin-Mutanten

A Die Substitution eines Asparagins (hier beispielhaft dargestellt für die Mutante $\alpha N312A\beta\gamma$) verursacht eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte SK-Übertragung auf den ENaC, da die Auslenkung der Extrazellulären Domäne (ED) verringert ist. **B** Der Verdau der verbliebenen Verbindung(en), bzw. der Extrazellulären Matrix durch Hyaluronidase (Hyal.) verursacht die Rückkehr der ED in den „Ruhezustand“. Da die ED jedoch im Vergleich zum Wt-ENaC geringer ausgeleuchtet war, sollte auch die durch Hyaluronidase verursachte Stromabnahme geringer ausfallen als beim Wildtyp.

Aus diesem Grund wurden sowohl Wt- $\alpha\beta\gamma$ ENaC-exprimierende Oozyten, als auch die Asparagin-Mutanten während TEVC-Messungen mit Hyaluronidase (300 U/ml) perfundiert und die daraus resultierende, prozentuale Abnahme des ΔI_{ENaC} (jeweils bezogen auf den Stromwert vor Hyaluronidase-Applikation) bestimmt.

Hyaluronidase verursachte beim Wildtyp eine Reduktion des ΔI_{ENaC} um $22 \pm 2\%$ ($n = 11$; $N = 4$), welche sich nicht signifikant von derjenigen bei den Mutanten $\alpha N232A\beta\gamma$, $\alpha N293A\beta\gamma$, $\alpha N312A\beta\gamma$ und $\alpha N397A\beta\gamma$ unterschied (vgl. Abb. 52). Bei der Mutante $\alpha N511A\beta\gamma$ war die durch Hyaluronidase verursachte Inhibition des ΔI_{ENaC} jedoch signifikant geringer als unter Kontrollbedingungen. Bei dieser ENaC-Mutante wurde der Strom durch Zugabe des Enzyms lediglich um $13 \pm 2\%$ reduziert ($n = 9$; $N = 3$; $p \leq 0,01$, Abb. 52).

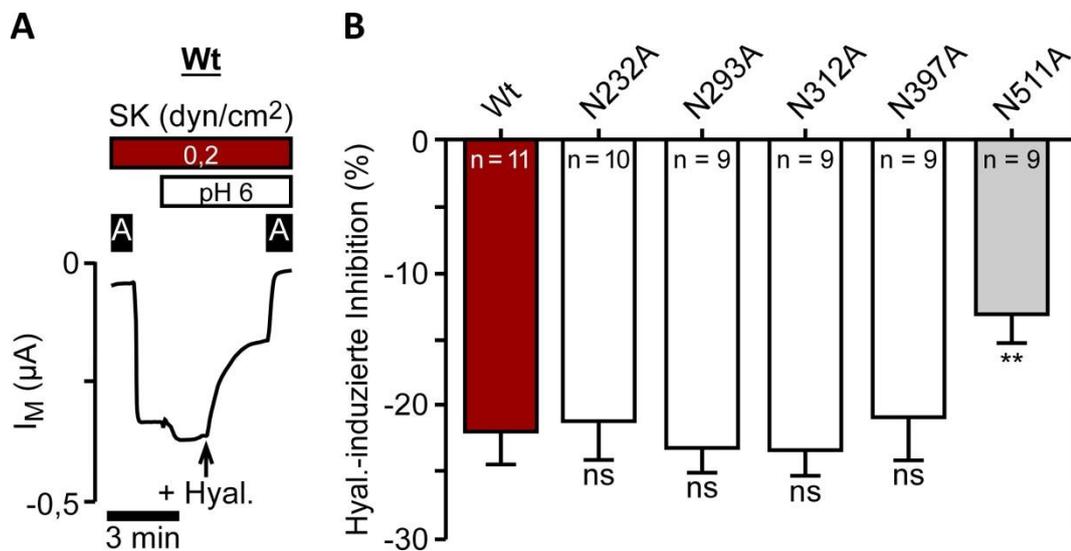


Abb. 52: Vergleich zur Wirkung von Hyaluronidase auf den ΔI_{ENaC} des Wildtyp-ENaC und der Asparagin-Mutanten

A Stromspur einer Wildtyp (Wt)- $\alpha\beta\gamma$ ENaC-exprimierenden Oozyte, die Hyaluronidase bei einem pH-Wert von 6 ausgesetzt war (+ Hyal.). Dies induzierte eine rapide Abnahme des transmembranen Stromes (I_M). **B** Vergleich der durch Hyaluronidase verursachten prozentualen Stromabnahme des Wt- $\alpha\beta\gamma$ ENaCs mit den Asparagin-Mutanten. Während die Mutanten, welche an Stelle 232, 293, 312 und 397 der α -Untereinheit ein Alanin (A) an Stelle eines Asparagins (N) trugen, keine Veränderung in Reaktion auf Hyaluronidase zeigten, war die Inhibition bei der Mutante $\alpha\text{N511A}\beta\gamma$ signifikant reduziert. Die Signifikanzniveaus ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$ und **: $p \leq 0,01$ beziehen sich jeweils auf den Wildtyp (Wt).

Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass zumindest über das Asparagin an Position 511 der α ENaC-Untereinheit eine Verbindung zur Extrazellulären Matrix besteht. Diese ist für die Wahrnehmung von SK essentiell, da bei ihrer Substitution sowohl die Sensitivität gegenüber SK (vgl. vorhergehender Abschnitt), als auch die durch Hyaluronidase induzierte Stromabnahme verringert ist.

4.1.3 Amilorid-Bindeaffinität

In weiteren Experimenten wurde sowohl für den Wt- $\alpha\beta\gamma$ ENaC (in An- und Abwesenheit von Hyaluronidase), als auch für die Asparagin-Mutanten die Bindeaffinität für den spezifischen ENaC-Blocker Amilorid bestimmt. Eine Änderung in der Bindeaffinität lässt Rückschlüsse darauf zu, ob die Aktivität des Kanals direkt beeinträchtigt wird – z.B. über eine Konformationsänderung, welche die Zugänglichkeit von Amilorid zu seiner Bindestelle reduziert.

Hierfür wurde Amilorid in aufsteigenden Konzentrationen (von 0,01 μM bis 100 μM) unter der Einwirkung von Scherkräften in Höhe von 0,2 dyn/cm^2 appliziert. Jede Konzentration wurde für die Dauer von 1 min appliziert, was zu einem dosisabhängigen und stufenförmigen Rückgang des I_M führte (siehe Abb. 53A). Anhand der Messwerte wurde die partielle

Inhibition für die jeweilige Amilorid-Konzentration ermittelt. Hierbei wurde die durch $100 \mu\text{M}$ Amilorid hervorgerufene Inhibition des I_M als 100 % Hemmung angesehen und davon ausgehend die partiellen Inhibitionen der übrigen Konzentrationen berechnet (vgl. Abb. 53B). Unter Zuhilfenahme der *Hill-Gleichung* konnte auf diese Weise der IC_{50} (*inhibition coefficient*) ermittelt werden, welcher angibt, welche Amilorid-Konzentration nötig ist, um den ENaC halbmaximal zu inhibieren.

In Anwesenheit von Hyaluronidase war der IC_{50} für den Wt- $\alpha\beta\gamma$ ENaC mit $0,26 \pm 0,04 \mu\text{M}$ ($n = 10$; $N = 2$) signifikant höher als unter Kontrollbedingungen (ohne Hyaluronidase: $0,09 \pm 0,01 \mu\text{M}$; $n = 23$; $N = 6$; $p \leq 0,01$; Abb. 54). Dies impliziert, dass durch die Degradierung von Komponenten der Extrazellulären Matrix mit Hyaluronidase deutlich mehr Amilorid vonnöten ist, um den ENaC zu hemmen.

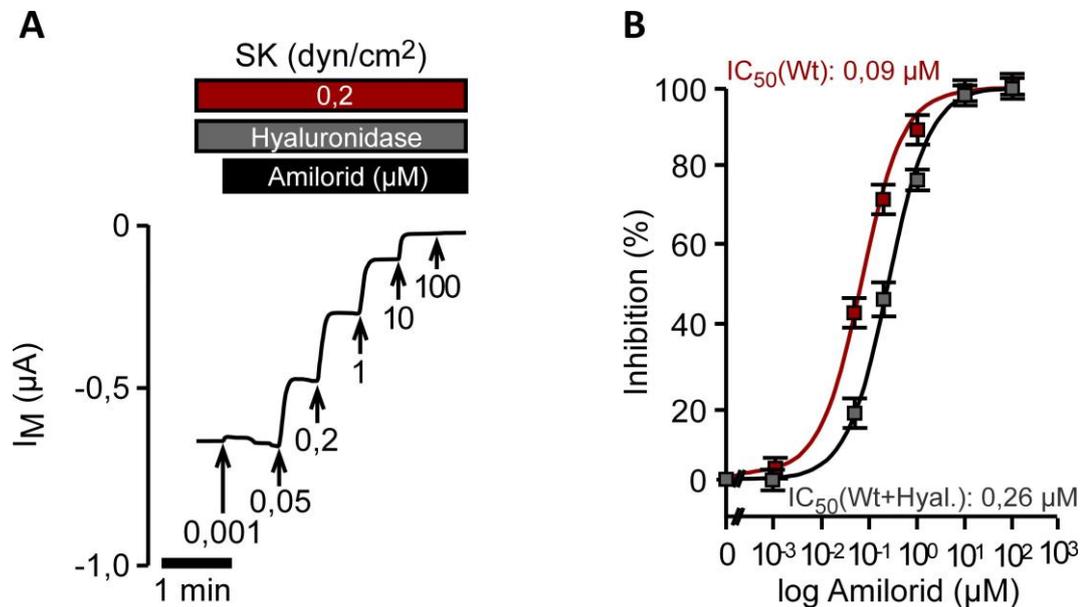


Abb. 53: Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung des IC_{50} für Amilorid

A Aufsteigende Amiloridkonzentrationen (von $0,001$ bis $100 \mu\text{M}$) wurden in Anwesenheit des Restriktionsenzym Hyaluronidase auf eine $\alpha\beta\gamma$ hENaC-exprimierende Oozyte appliziert, was zu einem dosisabhängigen Rückgang des Stromes führte. **B** Um den halbmaximalen Inhibitionskoeffizient von Amilorid (IC_{50} , *inhibition coefficient*) für den Wt- $\alpha\beta\gamma$ ENaC unter Kontrollbedingungen (ohne Hyaluronidase, rot; $n = 11$; $N = 3$), bzw. in Anwesenheit von Hyaluronidase (grau; $n = 10$; $N = 4$) zu ermitteln, wurden die Messwerte mit Hilfe der *Hill-Gleichung* angeglichen.

Auch bei den Asparagin-Mutanten $\alpha\text{N}312\text{A}\beta\gamma$ und $\alpha\text{N}511\text{A}\beta\gamma$ - welche eine reduzierte Sensitivität gegenüber SK aufwiesen - war dieser Wert mit $0,20 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ($\alpha\text{N}312\text{A}\beta\gamma$; $n = 7$; $N = 2$) und $0,19 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ($\alpha\text{N}511\text{A}\beta\gamma$; $n = 6$; $N = 2$) im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (vgl. Abb. 54).

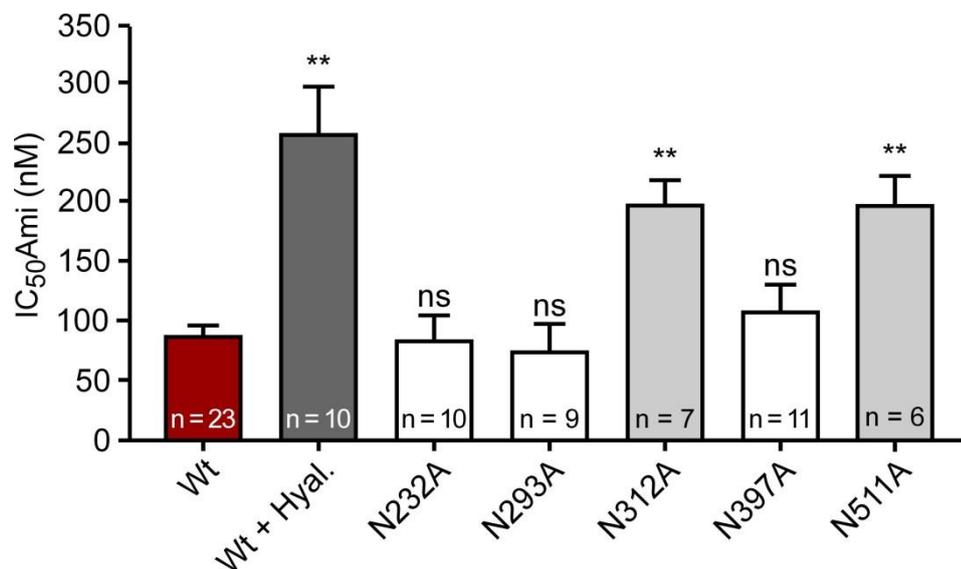


Abb. 54: Statistischer Vergleich der IC₅₀ für Amilorid

In Anwesenheit des Extrazelluläre Matrix-degradierenden Enzyms Hyaluronidase (Wt + Hyal), sowie bei den Asparagin-Mutanten α N312A $\beta\gamma$ und α N511A $\beta\gamma$ war der halbmaximale Inhibitionskoeffizient (IC₅₀) für Amilorid im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Wildtyp- $\alpha\beta\gamma$ ENaC, Wt) signifikant erhöht, während die Asparagin-Mutanten α N232A $\beta\gamma$, α N293A $\beta\gamma$ und α N397A $\beta\gamma$ keinen Unterschied zum Wt aufwiesen. Die Signifikanzniveaus ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$ und **: $p \leq 0,01$ beziehen sich jeweils auf den IC₅₀ des Wt.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich zum einen schließen, dass das Fehlen einer Verbindung zur Extrazellulären Matrix – sei es durch enzymatisches Degradieren der Extrazellulären Matrix *via* Hyaluronidase oder durch Entfernen der Verknüpfung mittels zielgerichteter Mutagenese – die ENaC-Aktivität direkt beeinträchtigt. Zum anderen deutet es darauf hin, dass eine fehlende Verankerung in der Extrazellulären Matrix vermutlich unter SK eine Konformationsänderung bewirkt, welche sich vom Wildtyp unterscheidet – da in diesem Falle die Zugänglichkeit des Blockers Amilorid zu seiner Bindestelle vermindert ist.

4.2 Generierung und Charakterisierung von Doppel-, bzw. Dreifach-Mutanten

Aus den bis zu diesem Punkt gewonnenen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die SK-Detektion des $\alpha\beta\gamma$ ENaC über die Verankerung der α -Untereinheit in der Extrazellulären Matrix erfolgt. Die im Vergleich zum Wildtyp reduzierten SK-Effekte der Asparagin-Mutanten α N312A $\beta\gamma$ und α N511A $\beta\gamma$ legen zudem nahe, dass die Verknüpfungspunkte möglicherweise an diesen Positionen lokalisiert sind. Eine Beteiligung zusätzlicher Verknüpfungsstellen lässt sich jedoch nicht grundsätzlich negieren, da es möglich wäre, dass erst beim Lösen mehrerer Verknüpfungsstellen in Kombination die Auswirkung auf den SK-Effekt sichtbar wird. In einem weiteren Schritt wurden daher (ausgehend von der Mutante

α N312A) Doppel-, bzw. eine Dreifach-Mutante generiert und ihr SK-Effekt bei Applikation von 0,2 dyn/cm² charakterisiert.

Es zeigte sich, dass sich das Ausmaß des SK-Effekts durch das zusätzliche Mutieren der mutmaßlichen Glykosylierungsstellen an den Positionen 232, 293 und 397 im Vergleich mit der Einzelmutante α N312A $\beta\gamma$ nicht signifikant reduzierte (siehe Abb. 55).

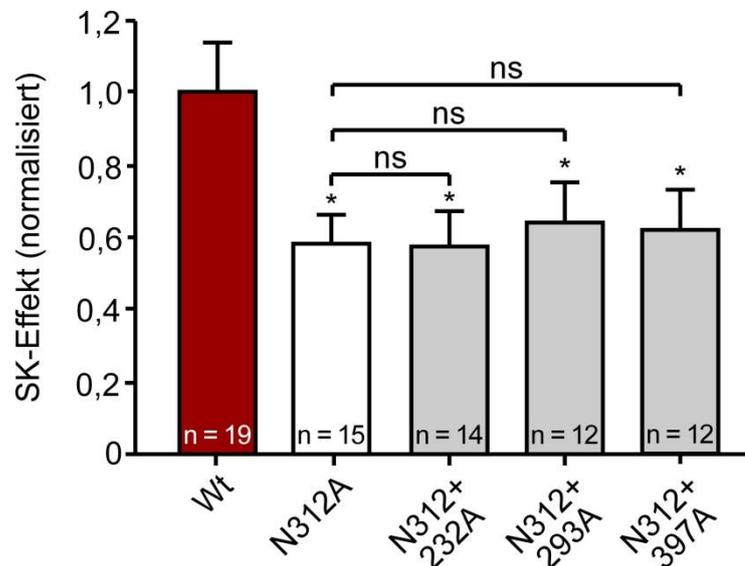


Abb. 55: Charakterisierung des SK-Effektes an Doppel-Asparagin-Mutanten des $\alpha\beta\gamma$ ENaC

Während die Einzel-Mutante α N312A $\beta\gamma$ im Vergleich zum Wildtyp (Wt) einen reduzierten SK-Effekt zeigte, führte das Entfernen zusätzlicher, potentieller Verknüpfungspunkte zur Extrazellulären Matrix an den Positionen N232, N293 und N397 der α -Untereinheit zu keiner additiven Beeinträchtigung des SK-Effekts. ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$; *: $p \leq 0,05$; sofern nicht anders angegeben, jeweils bezogen auf den SK-Effekt des Wildtyps (Wt).

Wurden jedoch die Asparagine 312 und 511 (welche jede für sich eine reduzierte Aktivierung in Reaktion auf SK zeigten) in Kombination mutiert – und damit beide mutmaßlichen Glykosylierungen, bzw. Verknüpfungen des α ENaC zur Extrazellulären Matrix entfernt – war der SK-Effekt weiter reduziert (siehe Abb. 56).

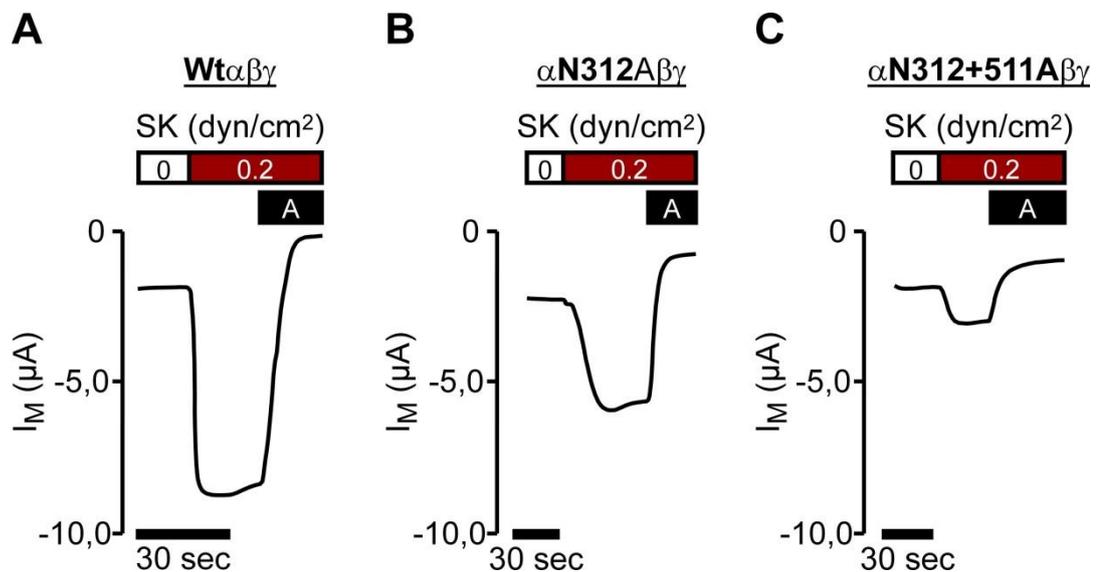


Abb. 56: Die gemeinsame Mutagenese der Asparagine 312 und 511 der α -Untereinheit reduzierte den SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC

A SK in Höhe von 0,2 dyn/cm² induzierte beim Wildtyp- $\alpha\beta\gamma$ ENaC einen rapiden Anstieg des transmembranen Stromes (I_M) **B** Der SK-Effekt war sichtbar reduziert, wenn das Asparagin N312 allein (α N312A $\beta\gamma$), bzw. **C** in Kombination mit N511 (α N312+511 $\beta\gamma$) mutiert wurde.

Für die Doppel-Mutante α N312+511A $\beta\gamma$ betrug der auf denjenigen des Wildtyps normalisierte SK-Effekt $0,15 \pm 0,03$ ($n = 15$; $N = 3$; $p \leq 0,01$). Dieser SK-Effekt wurde durch das Entfernen einer weiteren Glykosylierungsstelle über die Bildung einer Dreifach-Mutante nicht weiter reduziert (α N312+511+232A $\beta\gamma$: $0,21 \pm 0,03$; $n = 16$; $N = 3$; $p \leq 0,01$; Abb. 57).

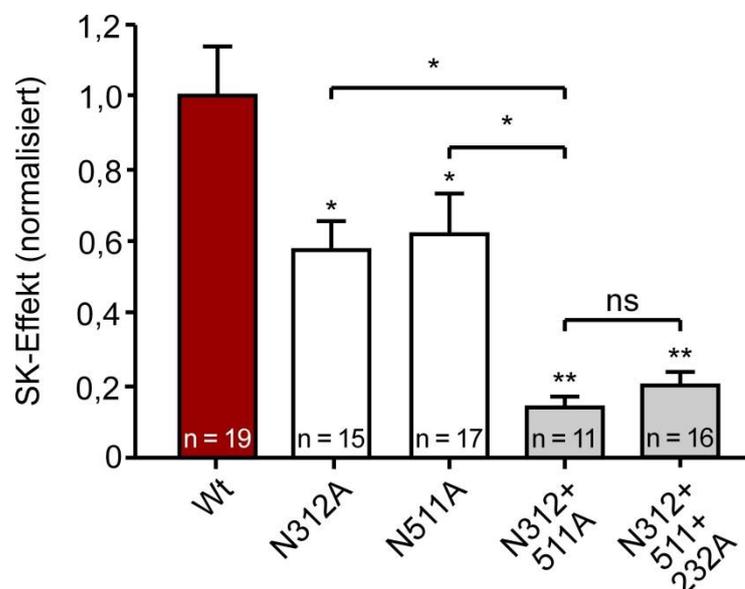


Abb. 57: Additive Reduktion des SK-Effekts durch Mutation der Asparagine 312 und 511

Die Einzelmutanten α N312A $\beta\gamma$ (N312A) und α N511 $\beta\gamma$ (N511A) zeigten einen im Vergleich mit dem Wildtyp $\alpha\beta\gamma$ ENaC (Wt) reduzierten SK-Effekt. Die Mutation beider Asparagine in Kombination (α N312+511A $\beta\gamma$) verursachte eine additive Reduzierung des SK-Effektes, welche durch das zusätzliche Einfügen einer Mutation an Position α N232A (N312+511+232A) nicht weiter reduziert wurde. ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; sofern nicht anders angegeben, jeweils bezogen auf den SK-Effekt des Wt.

Die vorliegenden Daten belegten somit erstmalig die Hypothese, dass der $\alpha\beta\gamma$ ENaC über die mutmaßliche Glykosylierung der Asparagine 312 und 511 innerhalb der Extrazellulären Domäne der α ENaC-Untereinheit mit der Extrazellulären Matrix verknüpft ist, und dass diese Verankerung zur Extrazellulären Matrix – zumindest im *X. laevis*-Expressionsmodell – essentiell ist, um SK detektieren zu können.

4.3 Theoretisches Strukturmodell des α ENaC zur Lokalisation der Asparagine 312 und 511

Um die exakte Position und Orientierung der Asparagine 312 und 511 innerhalb der Proteinstruktur der α ENaC-Untereinheit zu lokalisieren, wurde in Kooperation mit Pawel Szczesniak (*Institut für Anatomie und Zellbiologie*) und Dr. Mike Althaus (*Institut für Tierphysiologie*, beide Justus-Liebig-Universität Giessen) ein theoretisches, räumliches Homologie-Modell der α ENaC-Untereinheit erstellt, welches auf der Struktur des zum ENaC homologen ASIC1A basierte (Jasti *et al.* 2007, vgl. Abb. 58). Auf diese Weise sollte geprüft werden, ob es die Lokalisation der Asparagine ermöglicht, als Anknüpfungspunkte zur Extrazellulären Matrix zu dienen. Wie anhand der Abb. 58 deutlich wird, ist das Asparagin 312 exponiert an der Außenseite des α ENaC gelegen, während dasjenige an Position 511 an der Oberseite lokalisiert ist.

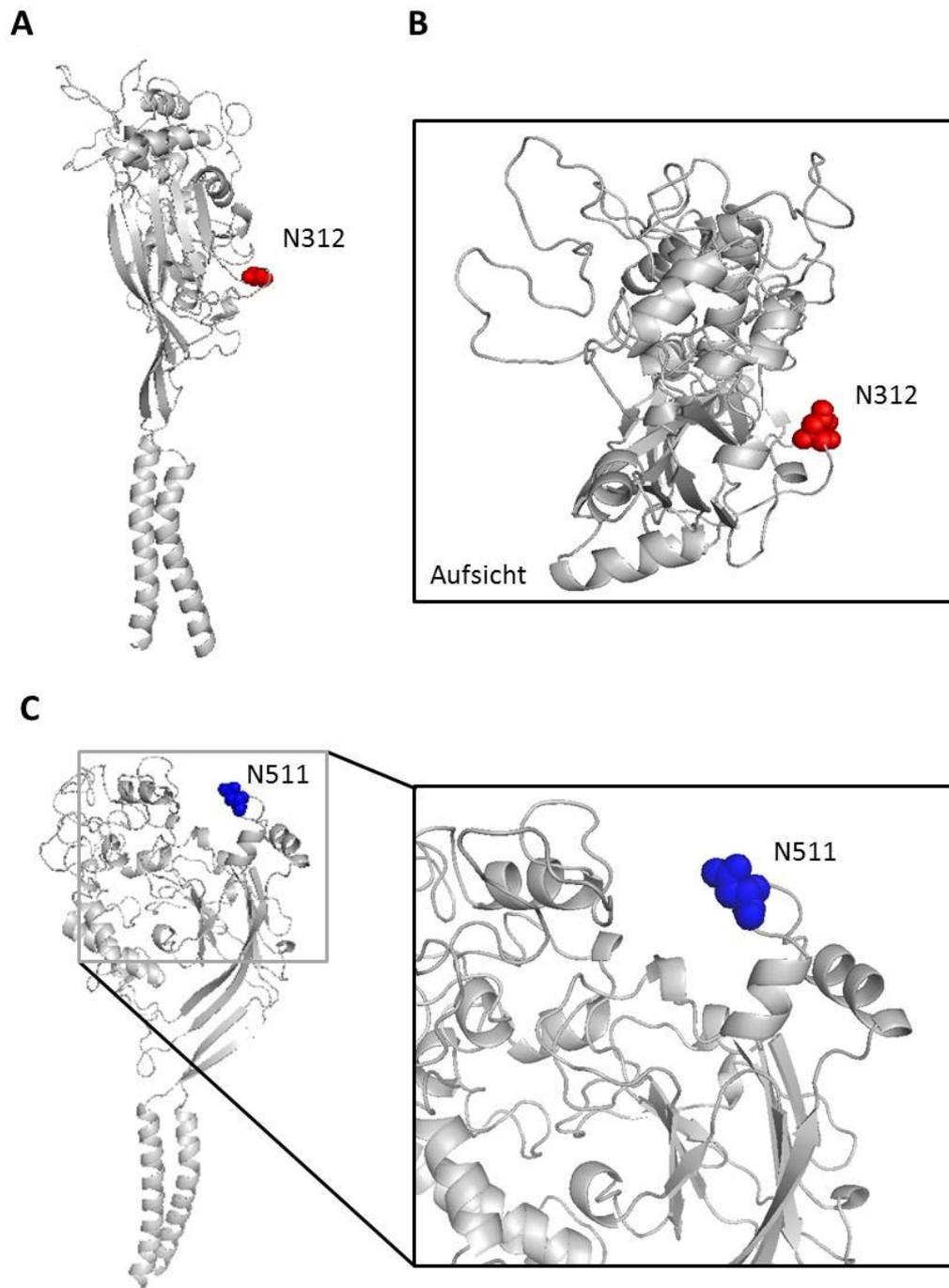


Abb. 58: Lokalisierung der Asparagine 312 und 511

Dargestellt ist die theoretische Cartoon-Struktur der α ENaC-Untereinheit, basierend auf der Struktur des zum ENaC homologen *acid sensing ion channel 1A* (ASIC1A) des Huhns (Jasti *et al.* 2007). Zur Akzentuierung der Asparagine 312 (rot; **A** und **B**) und 511 (blau; **C**) wurden diese als Kalotten-Modell dargestellt.

Das Asparagin 511 käme durch seine exponierte Lokalisation an der Oberfläche des Proteins als potentielle Anknüpfungsstelle in Frage. Anhand der Struktur der isolierten α ENaC-Untereinheit war jedoch nicht ersichtlich, ob das Asparagin 312 bei der Zusammenlagerung von drei Untereinheiten zu einem funktionellen Kanal dem Äußeren oder aber dem Inneren des Kanals zugewandt ist (und damit der Extrazellulären Matrix abgewandt wäre). Daher

wurde in einem weiteren Ansatz die theoretische Struktur eines Trimers, bestehend aus drei α ENaC-Untereinheiten simuliert. Hier zeigte sich, dass auch das Asparagin 312 an der Außenseite des Kanals lokalisiert ist (vgl. Abb. 59).

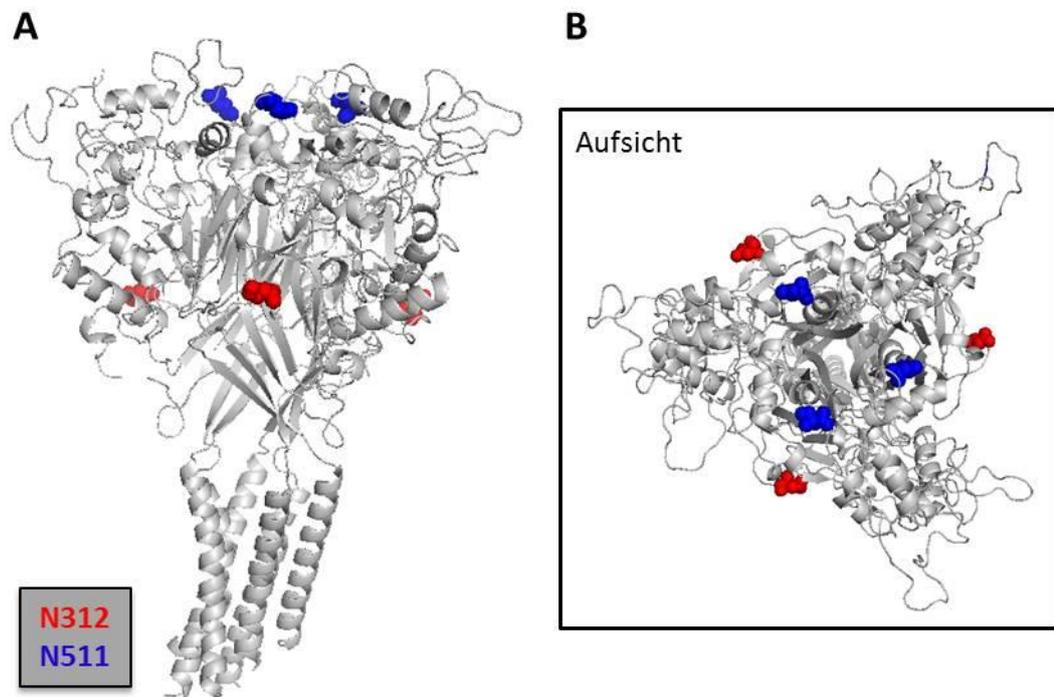


Abb. 59: Homologie-Modell eines α ENaC-Trimers

A Seiten-, sowie Aufsicht (**B**) auf die theoretische Struktur eines α ENaC-Trimers. Die Asparagine an den Positionen 312 (dargestellt in rot) und 511 (blau) sind exponiert an der Ober-, bzw. Außenseite des Kanals lokalisiert.

Abschließend wurde die Oberflächenstruktur des α ENaC-Trimers simuliert. Auch hier zeigte sich, dass beide Asparagine (N312 und N511) an der Oberfläche des ENaC lokalisiert sind und so als Anknüpfungsstellen zur Extrazellulären Matrix in Frage kommen.

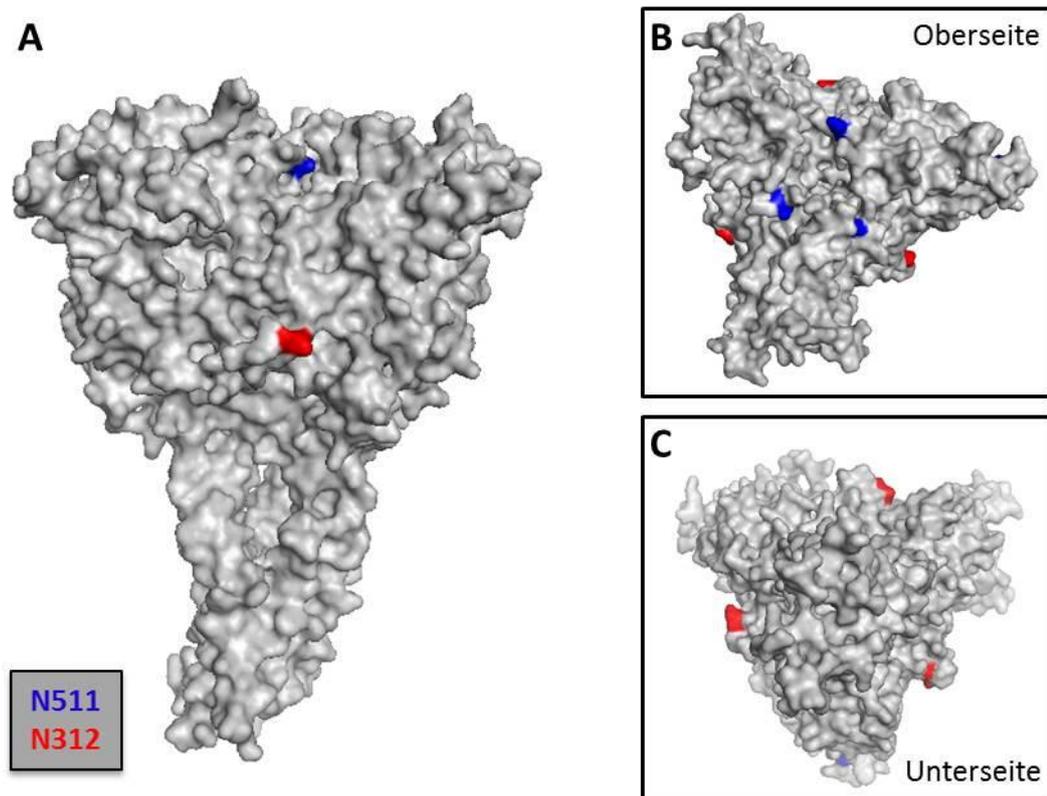


Abb. 60: Oberflächenstruktur des theoretischen α ENaC-Trimers

A Gezeigt ist die Seitenansicht, Aufsicht (**B**) und Ansicht der Unterseite (**C**) der hypothetischen Oberflächenstruktur des α ENaC-Trimers. Die Asparagine N312 (rot) und 511 (blau) sind auch in dieser Darstellung dem Äußeren zugewandt.

4.3.1 Lokalisierung der Asparagine 232, 293 und 397 in der 3D-Struktur

Auch die Positionen der drei übrigen Asparagine N232, N293 und N397, die im Zuge der Mutagenese-Experimente untersucht worden waren, wurden mit Hilfe des theoretischen Strukturmodells dargestellt. Wie anhand des Oberflächenmodells in Abb. 61 deutlich wird, sind diese drei Asparagine ebenfalls an der Oberfläche des Proteins lokalisiert und kämen damit als mögliche Bindestellen zur Extrazellulären Matrix in Betracht (vgl. Abb. 61). Allerdings wurde ihre Beteiligung an der SK-Wahrnehmung bereits ausgeschlossen (vgl. Abschnitt 5.1).

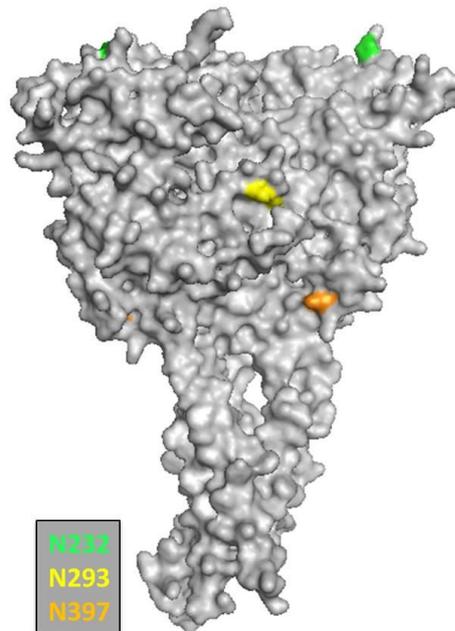


Abb. 61: Oberflächenmodell des α ENaC-Trimers zur Darstellung der Asparagine 232, 293 und 394

Seitenansicht auf das Oberflächen-Strukturmodell des α ENaC-Trimers. Die Asparagine 293 (gelb) 397 (orange) und 232 (grün) sind ebenfalls an der Oberfläche des Proteins lokalisiert.

Zusammenfassend kann an dieser Stelle folgendes festgehalten werden: Die Asparagine 312 und 511 – deren Mutation in einem verringerten SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC resultierte – kämen wegen ihrer exponierten Lokalisation durchaus als Verknüpfungsstellen zwischen ENaC und Extrazellulärer Matrix in Frage. Voraussetzung hierfür wäre jedoch eine Glykosylierung dieser Asparagine. Dies wurde in einem weiteren Schritt mittels Western Blot geprüft.

4.4 Western Blot zum Nachweis des Glykosylierungsstatus der α ENaC-Untereinheit

Um zu untersuchen, ob die Asparagine 312 und 511 der α ENaC-Untereinheit glykosyliert vorliegen, bzw. ihre Mutation in einer fehlenden Glykosylierung (und damit Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix) resultiert, wurde der Glykosylierungsstatus des Wildtyps und der Einzel- und Doppel-Mutanten mittels Western Blot nachgewiesen. Für diese Experimente wurde eine α ENaC-Untereinheit verwendet, welche einen C-terminalen HA-tag trug. Dies erlaubte im Zuge des Western Blot-Verfahrens die spezifische Detektion der α ENaC-Untereinheit mittels gegen den HA-tag gerichteter Antikörper. Nach Generierung der entsprechenden Mutanten wurden die HA-getaggten α ENaC-Untereinheiten (HA- α Wt,

HA- α N312A, HA- α N511A und HA- α N312+511A) jeweils in Kombination mit β und γ in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Anschließend wurde der SK-Effekt dieser HA-getaggten Kanäle durch Erhöhung der SK von 0 auf 0,2 dyn/cm² bestimmt. Dies geschah um sicherzustellen, dass auch der SK-Effekt der HA-getaggten Asparagin-Mutanten im Vergleich zum HA-getaggten Wildtyp (Wt) verringert war.

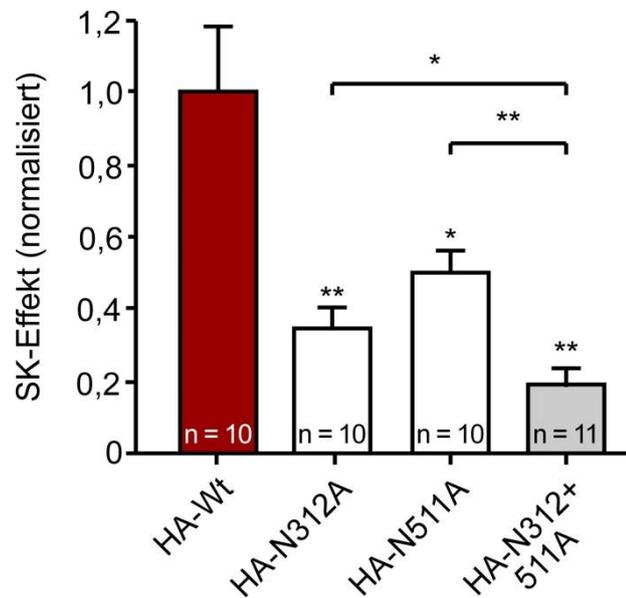


Abb. 62: SK-Effekt des HA-getaggten Wt- $\alpha\beta\gamma$ ENaC, sowie der Asparagin-Einzel-Mutanten α N312A $\beta\gamma$, α N511A $\beta\gamma$ und der Doppel-Mutante α N312+511A $\beta\gamma$

Das Substituieren der Asparagine N312 und N511 innerhalb der Extrazellulären Domäne der HA-getaggten α ENaC-Untereinheit führte zu einer Reduktion des SK-Effektes, welcher bei der Doppel-Mutante (HA- α N312+511A $\beta\gamma$) additiv war. Die Signifikanzniveaus *: $p \leq 0,05$ und **: $p \leq 0,01$ beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, jeweils auf den SK-Effekt des Wildtyps (HA- α Wt).

Wie aus Abb. 62 ersichtlich, zeigten auch die Einzel-Mutanten HA- α N312A $\beta\gamma$ - und HA- α N511A $\beta\gamma$ ENaC eine reduzierte Sensitivität gegenüber Scherkraft – verglichen mit dem HA-getaggten Wt- $\alpha\beta\gamma$ ENaC. Auch bei der Mutation beider Glykosylierungsstellen gemeinsam (HA- α N312+511A $\beta\gamma$ ENaC) zeigte sich eine additive Reduktion des SK-Effektes. Da der angehängte HA-tag die Reaktion des ENaC auf SK nicht beeinflusste, konnten die HA-getaggten Kanäle für den Nachweis der Glykosylierungsstatus genutzt werden.

Hierzu wurden die Oozyten, welche die HA-getaggten ENaCs (Wt, Einzel- und Doppel-Mutante) exprimierten, lysiert. Die im Lysat enthaltenen Proteine wurden im Anschluss daran aufgereinigt und *via* SDS-PAGE elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt.

Basierend auf der Annahme, dass die α ENaC-Untereinheit bei vorhandener Glykosylierung ein höheres Molekulargewicht aufweisen sollte als bei unvollständiger oder fehlender Glykosylierung, müssten die Mutanten im Vergleich mit dem Wt ein geringeres Molekulargewicht besitzen und demzufolge im Gel weiter laufen.

Wie aus Abb. 63 ersichtlich, waren beim Wt- α ENaC zwei Banden mit einem Molekulargewicht von ~ 80 und ~ 70 kDa sichtbar. Während die Bande mit ~ 80 kDa ein bereits beschriebenes *cleavage*-Produkt des α ENaC repräsentiert (Harris *et al.* 2008), handelt es sich bei der zweiten Bande (mit geringerem Molekulargewicht) vermutlich um die deglykosylierte Form dieses *cleavage*-Produkts. Dies lässt sich aus der Tatsache schließen, dass der durch enzymatische Behandlung mit PNGase F vollständig deglykosylierte Wt- α ENaC (Wt + PNGase F) nur eine einzige Bande auf identischer Höhe aufwies (~ 70 kDa, vgl. Abb. 63). Das Substituieren der Asparagine 312 und 511 verursachte bei beiden Einzel-Mutanten (im Vergleich zum Wt) einen *shift* der oberen Bande um ~ 2 kDa hin zu einem geringeren Molekulargewicht, während die untere (deglykosylierte) Bande keine Veränderung aufwies. Bei der Doppel-Mutante war dieser *shift* mit ~ 4 kDa noch deutlicher ausgeprägt. Die Größe dieser Bande unterschied sich dabei nicht von derjenigen, welche nach Behandlung des Wt- α ENaCs mit Hyaluronidase erhalten wurde (Wt + Hyal. Siehe Abb. 63).

Diese Ergebnisse belegen sowohl die Annahme, dass die Asparagine 312 und 511 glykosyliert vorliegen, als auch die Tatsache, dass sich die Glykosylierung des α ENaC durch den Einsatz des Enzyms Hyaluronidase entfernen lässt.

Als Kontrolle für die Spezifität der Antikörper diente zusätzlich ein Proteinextrakt, welcher aus nativen, nicht injizierten Oozyten gewonnen wurde (n.i., siehe Abb. 63). In dieser Probe waren nur einige äußerst schwache und unspezifische Banden zu erkennen. Dies bestätigt die Tatsache, dass es sich bei den in den restlichen Proben detektierten Banden um den α ENaC handelte.

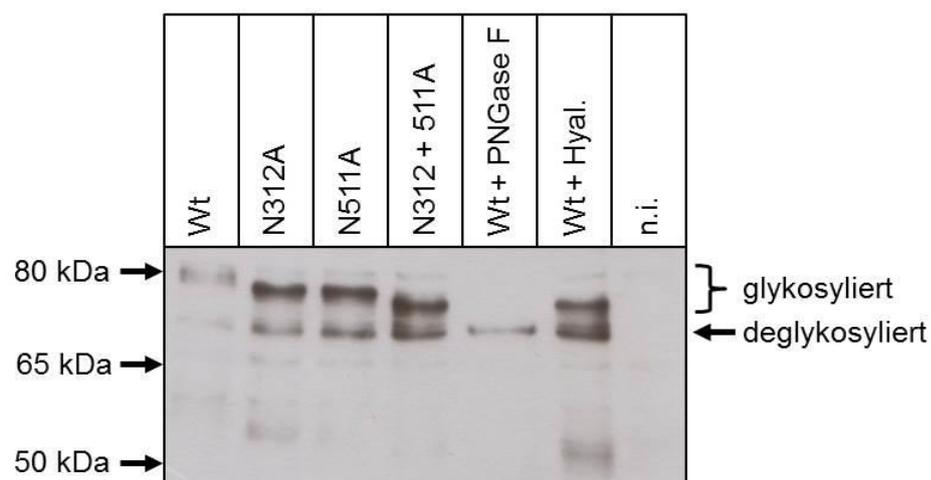


Abb. 63: Western Blot zum Nachweis des Glykosylierungsstatus der α ENaC-Untereinheit

Der Wildtyp- α ENaC (Wt) zeigte 2 Banden, von denen die obere (bei ~ 80 kDa) ein *cleavage*-Produkt des α ENaC darstellt, die untere (bei ~ 70 kDa) die deglykosylierte Form dieses Fragments. Die Einzel-Mutanten (N312A und N511A) zeigten einen *shift* der oberen Bande um ~ 2 kDa, die Doppel-Mutante (N312+511A) um ~ 4 kDa hin zu einem geringeren Molekulargewicht. Bei vollständiger Deglykosylierung des Wildtyps durch das Enzym PNGase F (Wt + PNGase F) war lediglich eine einzelne Bande bei ~ 70 kDa sichtbar. Behandlung des Wt mit Hyaluronidase (Wt + Hyal.) resultierte ebenfalls in einem Molekulargewicht, welches sich mit der Doppel-Mutante (N312+511A) auf einer Höhe befand. Ein Proteinextrakt, gewonnen aus nicht injizierten Kontroll-Oozyten (n.i.) diente dem Nachweis der Antikörper-Spezifität. Abbildung repräsentativ für $n = 6$.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Substitutionen der Asparagine 312 und 511 gegen Alanine in einem reduzierten Glykosylierungsstatus der α ENaC-Untereinheit resultieren. In Kombination mit der Erkenntnis, dass die Asparagin-Mutanten eine geringere Sensitivität gegenüber Scherkraft (SK) aufweisen und beides – sowohl der Glykosylierungsstatus, als auch die SK-Insensitivität – bei der Doppel-Mutante (α N312+511A $\beta\gamma$) additiv ist, lässt sich schlussfolgern, dass die SK-Wahrnehmung des $\alpha\beta\gamma$ ENaC über die Glykosylierung dieser beiden Asparagine und damit einer Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix erfolgen könnte.

4.5 Charakterisierung der SK-insensitiven α ENaC-Doppel-Mutante N312+511A

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Unterschiede in Reaktion auf SK tatsächlich auf eine verminderte SK-Wahrnehmung und nicht etwa auf eine durch die eingefügte Mutation bedingte Änderung der grundlegenden Kanaleigenschaften zurückzuführen ist, fokussierten sich weitere Untersuchungen auf die Charakterisierung der SK-insensitiven Doppel-Mutante (α N312+511A $\beta\gamma$ ENaC). Hierfür wurde diese Mutante zunächst in *Xenopus* Oozyten exprimiert und ihre Eigenschaften elektrophysiologisch mittels der TEVC-, sowie der *Patch Clamp*-Technik charakterisiert. Als Kontrolle diente jeweils der Wildtyp (Wt) $\alpha\beta\gamma$ ENaC.

4.5.1 Vergleich des ΔI_{ENaC} in Ab- und Anwesenheit von Scherkräften

Da die N-Glykosylierung in den Transport von Membranproteinen zur Zelloberfläche involviert ist (Vagin *et al.* 2009), wäre es möglich, dass die reduzierte Glykosylierung der Doppel-Mutante die Expression der Kanäle negativ beeinflusst. Dies würde bedeuten, dass bei Injektion identischer Mengen an cRNA im Vergleich zum Wildtyp weniger Kanäle auf die Zelloberfläche gelangen, die durch Scherkraft aktiviert werden können. In diesem Fall wäre der bei der Doppel-Mutante beobachtete reduzierte SK-Effekt lediglich auf eine verminderte Anzahl von ENaCs zurückzuführen und nicht auf eine reduzierte SK-Sensitivität des Kanals. Wenn die Expression der Doppel-Mutante jedoch nicht beeinträchtigt ist (und sich demzufolge die Anzahl der Kanäle auf der Zelloberfläche nicht unterscheidet), dann sollte auch der ENaC-vermittelte Strom (ΔI_{ENaC}) in Abwesenheit von SK keine Unterschiede zwischen Wt und Doppel-Mutante aufweisen. Erst unter SK sollte der ΔI_{ENaC} des Wt im Vergleich zur Doppel-Mutante signifikant erhöht sein – da dieser durch die intakte Verbindung zur Extrazellulären Matrix die Scherkräfte detektieren kann, während die SK-Wahrnehmung der Doppel-Mutante durch die fehlende Verbindung reduziert ist.

Um dies zu verifizieren, wurde zunächst der ENaC-vermittelte Strom (ΔI_{ENaC}) beider Kanäle (Wt und Doppel-Mutante) sowohl in Ab-, als auch Anwesenheit von Scherkraft (0 bzw. 0,2 dyn/cm²) bestimmt.

Wie aus Abb. 64 ersichtlich, unterschied sich die Höhe des ΔI_{ENaC} der Doppel-Mutante in Abwesenheit von Scherkraft (0 dyn/cm²: ΔI_{ENaC} : $2,4 \pm 0,6 \mu\text{A}$; n = 11; N = 2) nicht signifikant von demjenigen des Wt- $\alpha\beta\gamma$ ENaC (ΔI_{ENaC} : $2,3 \pm 0,6 \mu\text{A}$; n = 13; N = 3; p = 0,9). Unter einwirkender Scherkraft in Höhe von 0,2 dyn/cm² belief sich der Strom des Wt- $\alpha\beta\gamma$ ENaCs jedoch auf $10,4 \pm 2 \mu\text{A}$ (n = 13; N = 3), während derjenige der Doppel-Mutante mit $4,0 \pm 0,6 \mu\text{A}$ (n = 11; N = 3) unter gleichen Bedingungen signifikant geringer war (p ≤ 0,01).

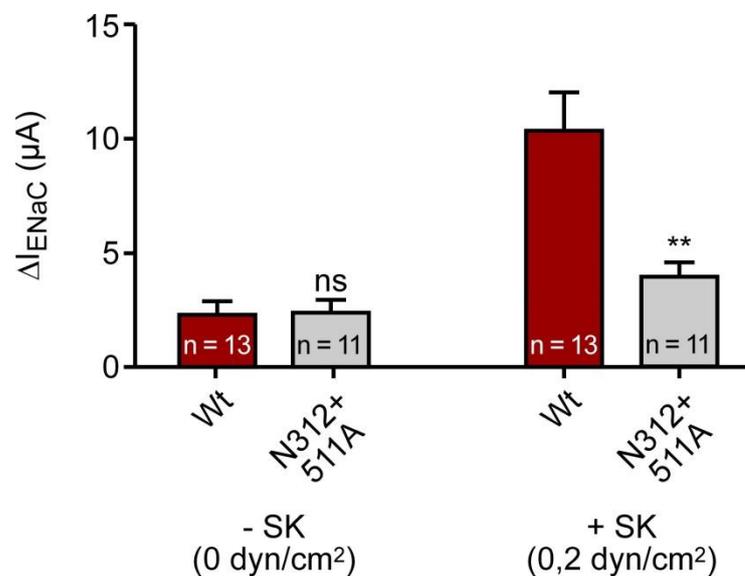


Abb. 64: Vergleich des ΔI_{ENaC} vom Wildtyp- $\alpha\beta\gamma$ ENaC und der Doppel-Mutante (N312+511A) in An- und Abwesenheit von Scherkraft

Während sich der ENaC-vermittelte Strom (ΔI_{ENaC}) bei Abwesenheit von Scherkraft (- SK, 0 dyn/cm²) zwischen Wildtyp- $\alpha\beta\gamma$ ENaC (Wt) und Doppel-Mutante ($\alpha\text{N312}+\beta\text{511A}$) nicht signifikant unterschied, war er bei einwirkender Scherkraft (+ SK, 0,2 dyn/cm²) beim Wt im Vergleich mit der Doppel-Mutante signifikant erhöht. ns (nicht signifikant): p ≥ 0,05; ** ≤ 0,01, jeweils bezogen auf den Wt.

Die Tatsache, dass sich die Höhe des ΔI_{ENaC} in Abwesenheit von SK nicht unterschied, deutet auf eine vergleichbare Anzahl von Kanälen auf der Zelloberfläche hin. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Expression der Kanäle durch die fehlende Glykosylierung vermutlich nicht beeinträchtigt wird. Da die Applikation von SK in einer ungleich höheren Aktivierung des Wildtyp- $\alpha\beta\gamma$ ENaCs im Vergleich zur Doppel-Mutante resultierte, kann angenommen werden, dass der geringere ΔI_{ENaC} unter einwirkender SK bei der Doppel-Mutante tatsächlich auf eine reduzierte Mechanosensitivität dieses Kanals zurückzuführen ist.

Diese Annahme bestätigte sich auch bei Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve für SK. Hierfür wurden Oozyten, die entweder den Wildtyp $\alpha\beta\gamma$ ENaC (Wt), oder die Doppel-Mutante N312+511A exprimierten, Scherkräften zwischen 0,002 und 1,3 dyn/cm² ausgesetzt und der jeweilige SK-Effekt bestimmt. Wie in Abb. 65 dargestellt, fiel der SK-Effekt der Doppel-Mutante bei gleicher SK-Rate jeweils deutlich geringer aus als beim Wildtyp. Auch dies unterstützte die Hypothese, dass die Doppel-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Mechanosensitivität aufweist.

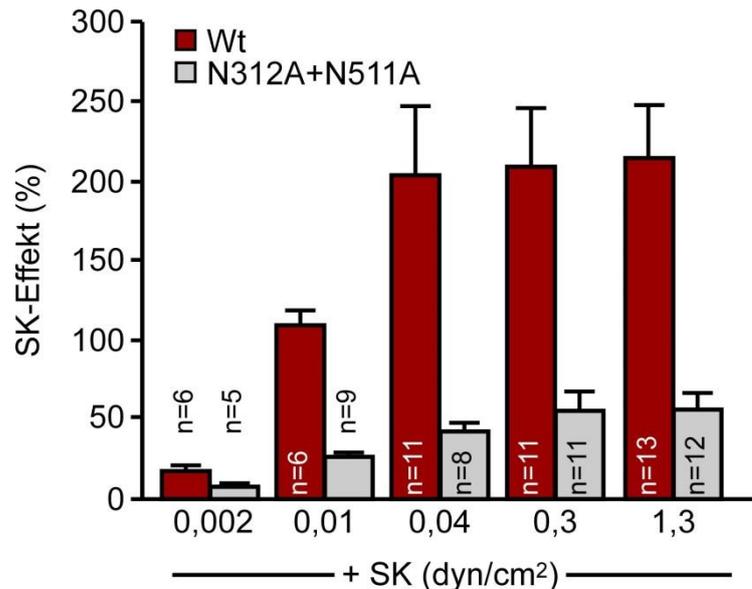


Abb. 65: Dosis-Wirkungskurve für SK bei Wildtyp-ENaC und Doppel-Mutante

Die Applikation von Scherkräften in Größenordnungen von 0,001 bis 1,3 dyn/cm² induzierte eine Dosis-abhängige Aktivierung beider Kanäle. Die Aktivierung des Wildtyp- $\alpha\beta\gamma$ ENaCs (Wt) war jedoch bei gleicher SK-Rate stets deutlich stärker als diejenige der Doppel-Mutante (α N312+511A $\beta\gamma$).

4.5.2 Charakteristika der Doppel-Mutante auf Einzelkanalebene

Abschließende Messungen beschäftigten sich mit der Frage, ob sich die Doppel-Mutante in ihren Einzelkanal-Eigenschaften vom Wildtyp unterscheidet. Hierfür wurden sowohl der Wildtyp $\alpha\beta\gamma$ ENaC (Wt), als auch die Doppel-Mutante (α N312+511A $\beta\gamma$) in *Xenopus* Oozyten exprimiert und ihre Eigenschaften auf Einzelkanalebene mittels der *Patch Clamp*-Technik im *Cell Attached* Modus charakterisiert. Zunächst wurde die Leitfähigkeit der beiden Kanäle bestimmt, indem in einem Spannungsbereich von +20 mV bis -100 mV die Kanalampplituden ausgemessen wurden (vgl. Abb. 66).

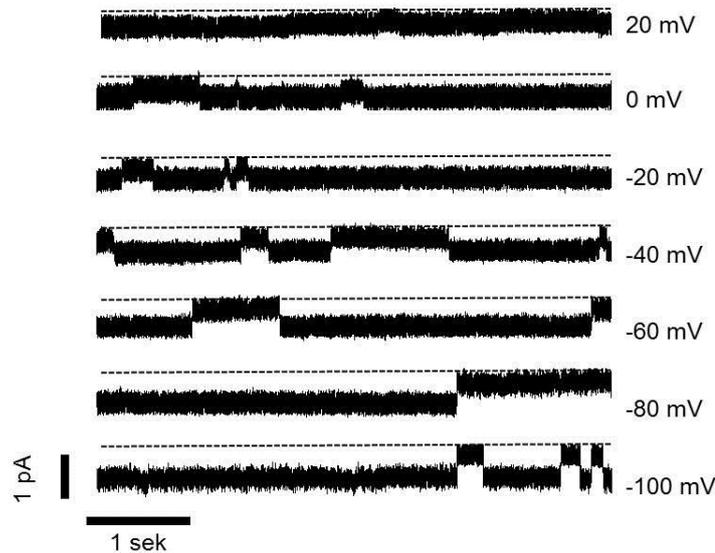


Abb. 66: Einzelkanalableitungen des Wildtyp- $\alpha\beta\gamma$ ENaC in der *Cell Attached* Konfiguration bei verschiedenen Membranspannungen

Aufzeichnung einer *Patch Clamp*-Messung am Wildtyp $\alpha\beta\gamma$ ENaC bei angelegten Membranspannungen von +20 mV bis -100 mV. Die gestrichelte Linie gibt jeweils den geschlossenen Zustand des Kanals an. Eine Auslenkung der Stromspur nach unten repräsentiert das Öffnen des Kanals. Abbildung repräsentativ für $n = 8$.

Zur Erstellung einer Strom/Spannungs-Kurve (I/V-Kurve) wurden die Kanalampplituden gegen die jeweilige Spannung aufgetragen und unter Zuhilfenahme der *Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung* angeglichen (siehe Abb. 67). Auf diese Weise wurde für beide Kanäle die Permeabilität für Na^+ bestimmt, welche bei einer Extrazellulären Na^+ -Konzentration von 90 mM (Pipettenlösung) und einer intrazellulären von 11 mM (Wert gemittelt nach Sobczak *et al.* 2010) bei beiden Kanälen jeweils $1,72 \times 10^{-12} \text{ cm}^3/\text{s}$ betrug.

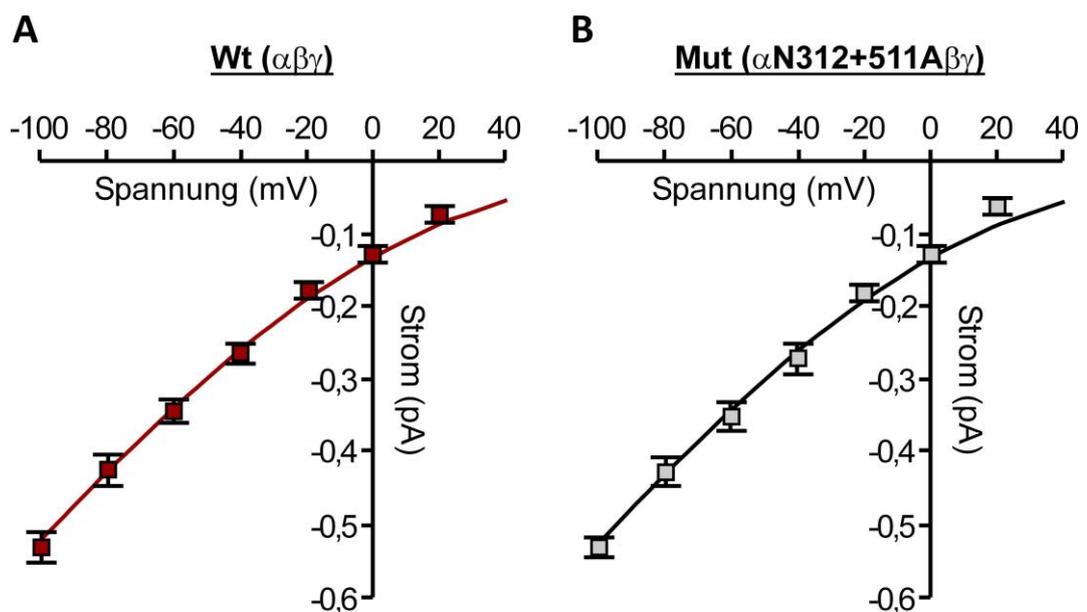


Abb. 67: I/V-Kurven für den Wildtyp $\alpha\beta\gamma$ ENaC, sowie die Doppel-Mutante $\alpha\text{N312}+\text{511A}\beta\gamma$
A Strom/Spannungskurve für den Wildtyp $\alpha\beta\gamma$ ENaC und die Doppel-Mutante $\alpha\text{N312}+\text{511A}\beta\gamma$ (**B**). Aufgetragen ist die jeweils gemessene Kanalampplitude gegen die zugehörige Spannung. Die erhaltenen Werte wurden anschließend mit Hilfe der *Goldmann-Hodgkin-Katz-Gleichung* angeglichen.

Alle weiteren Einzelkanal-Parameter wurden bei einer vorgegebenen Membranspannung von -100 mV charakterisiert. Zunächst wurde die Leitfähigkeit (G) beider Kanäle bestimmt, welche beim Wt $5,3 \pm 0,02$ pS ($n = 8$; $N = 6$) betrug und sich damit nicht von derjenigen der Doppel-Mutante mit $5,3 \pm 0,01$ pS ($n = 8$; $N = 5$; $p = 0,9$) unterschied. Auch in ihrer Offenwahrscheinlichkeit (P_o), bzw. relativen Offenwahrscheinlichkeit (NP_o) unterschieden sich die beiden Kanäle nicht signifikant voneinander (vgl. Tab. 24). Diese wurde bestimmt, indem die Kanalereignisse über einen Zeitraum von ca. 5 min aufgezeichnet und ausgewertet wurden. Im Zuge dessen wurde zusätzlich die mittlere Offen- (t_o), bzw. Geschlossenzeit (t_c) der Kanäle bestimmt, sowie die Anzahl der aktiven Kanäle (N) im Membranfleck (*Patch*). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Doppel-Mutante und Wildtyp. Detailliert aufgelistet sind die ermittelten Werte in Tab. 24.

Tab. 24: Einzelkanal-Charakteristika des Wildtyps- $\alpha\beta\gamma$ ENaC und der Doppel-Mutante $\alpha N312+511A\beta\gamma$

	n	G (pS)	P_o	NP_o	N	t_o (s)	t_c (s)
Wt	8	$5,3 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,8$	$10,1 \pm 4,6$
Mut	8	$5,3 \pm 0,01$	$0,3 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,5$	$3,7 \pm 1,1$	$24,3 \pm 17,2$

Sämtliche Messungen wurden bei einer Membranspannung von -100 mV im *cell attached* Modus durchgeführt. Die ermittelten Werte sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, wobei

Wt: Wildtyp ($\alpha\beta\gamma$ ENaC)

Mut: Doppel-Mutante $\alpha N312+511A\beta\gamma$ ENaC

n: Anzahl der Messungen

P_o : Offenwahrscheinlichkeit

NP_o : Relative Offenwahrscheinlichkeit

N: Anzahl der aktiven Kanäle im Membranfleck (*Patch*)

t_o : mittlere Offenzeit

t_c : mittlere Geschlossenzeit

Die Signifikanz wurde mit Hilfe des ungepaarten t-test nach Student bestimmt. Es waren für keinen der untersuchten Parameter signifikante Unterschiede zwischen Doppel-Mutante (Mut) und Wildtyp (Wt) nachweisbar ($p \geq 0,05$).

Sämtliche *Patch Clamp*-Messungen wurden in der *Cell Attached*-Konfiguration durchgeführt, d.h. in Abwesenheit von SK. Die Einzelkanal-Charakteristika der Doppel-Mutante – welcher die Verbindung zur Extrazellulären Matrix fehlt – unterschieden sich unter diesen Bedingungen nicht vom Wildtyp. Dies spricht einmal mehr für die Tatsache, dass durch das Entfernen der Glykosylierung und damit der Zerstörung der Verbindung zur Extrazellulären Matrix lediglich die mechanosensitive Wahrnehmung des Kanals beeinträchtigt ist, während die basalen Charakteristika hiervon unbeeinflusst bleiben. Somit liefern die Befunde der vorliegenden Dissertation erstmalig einer Erklärung für den der SK-Wahrnehmung des $\alpha\beta\gamma$ ENaC zugrundeliegenden molekularen Mechanismus.

5 Substitution von Asparaginen in der Extrazellulären Domäne des δ 1ENaC

Auch in der Extrazellulären Domäne der δ ENaC-Untereinheit sind drei Asparagine lokalisiert, welche, da sie innerhalb der für eine Glykosylierung notwendigen Konsensus-Sequenz (Asn – X – Ser/Thr) vorliegen, potenzielle Verknüpfungsstellen zur Extrazellulären Matrix darstellen. Sie liegen an den Positionen 166, 211 und 384, sind jedoch zwischen der α - und δ -Untereinheit nicht konserviert (vgl. Abb. 68).

α ENaC	MEGNKLEEQDSSPPQSTPGLMKGNKREE-QGLGPEPA-APQQPTAEEEEALIEFHRSYRE	57
δ 1ENaC	--PCHLKGWQHRPTQHNAACKQGQAAAQTPPRPGPPSAPPPPKKEGHQEGLVELPASFRE	58
α ENaC	LFEFFCNNTTIHGAI RLVC SQHNRMKTAFAVAVLWLC TFGMMYWQFGLLFGEYFSYPVSLN	117
δ 1ENaC	LLTFFCTNATI HGAI RLVC SRGNRLKTTSGWGLLSL GALVALCWQLGLL FERHWHRPV LMA	118
α ENaC	INLNSDKLVFPAVTICTLNPYRYPEIKEELEELDRITEQTLFDLYKYSSFTTLVAGRSR	177
δ 1ENaC	VSVHSERKLLPLVTLCDGNPRRPSVLRHLELLEDEFARENIDSLYNVL-----SKGR	171
α ENaC	RDLRGTLPHPQLRRLVPPPHGARRARSVASSLRDNNPQVDWKDWKIGFQLCNOIKSDCF	237
δ 1ENaC	AALSATVPR-----HEPFFHLDREIR-----LQRLSHSGSRVRVGFRLCSTGGDCF	218
α ENaC	YQTYSSGVDVREWYRFHYINILSRLPETLPSLEEDTLGNFIFACRFNQVSCNQANYSHF	297
δ 1ENaC	YRGYTSGVAAVQDWYHFHYVDILALLPAAWEDSHGSDGHFVLSVCSYDGLDCARQFRTF	278
α ENaC	HHPMYGNCYTFNDKINNSNLWSSMPGINNGLSLMLRAEQNDFIPLLSTVTGARVMVHGQD	357
δ 1ENaC	HHPTYGSCYTVD-----GVWTAQRPGITHGVGLVLRVEQQPHLPLLSTLAGIRVMVHGRN	333
α ENaC	EPAFMDGGFNLRPGVETSISMRKETLDRLGDDYGDCTKNGSDVPVENLYPSKYTQQVCI	417
δ 1ENaC	HTPFLGHHSFSVRPGTEATISIREDEVHRLGSPYGHCTAGGEGVEVELLHNTSYTRQACL	393
α ENaC	HSCFQESMIKECGCAYIFYPRPQNVEYCDYRKHSWGYCYKLVDFSSDHLGCFTKCRK	477
δ 1ENaC	VSCFQQLMVETCSCGYLHPLPAGAECSSARHPAWGHCFYRLYQDLETHRLPCTSRCP	453
α ENaC	PCSVTSYQLSAGYSRWPSVTSQEWVFQMLSRQNNY-TVNNKRNQVAKVNIFFKELNYKTN	536
δ 1ENaC	PCRESAFKLSTGTSRWPSAKSAGWTLATLGEQGLPHQSHRQRSSLAKINIVYQELNYSV	513
α ENaC	SESPSVTMTLLSNLGSQWLSLWFGSSVLSVEMAEVFDLLVIMFLMLLRRFRSRYWSPG	596
δ 1ENaC	EEAPVYSVPQLLSAMGSLCSLWFGASVLSLLELELLLDASALTLVLGGRRRLRRAWFSWP	573
α ENaC	RG-GRGAQEVASTLASSPPSHFCPPMSLSLSQPGPAPSALTAPPPAYATLGRPRSPG	654
δ 1ENaC	RASPASGASSIKPEASQMP-----PPAGGTSDDPE-----PSGPHLPRVMLPG	616

Abb. 68: Sequence Alignment der α - und δ 1ENaC-Untereinheit

Drei Asparagine (N) innerhalb der Extrazellulären Domäne der δ 1ENaC-Untereinheit stellen mögliche Glykosylierungsstellen dar (hervorgehoben in grün). Diese sind jedoch im Vergleich zu den glykosylierten Asparaginen zur α ENaC-Untereinheit (hervorgehoben in schwarz) nicht konserviert. Die beiden Transmembrandomänen wurden grau hinterlegt, der dazwischenliegende Bereich repräsentiert die Extrazelluläre Domäne.

Diese drei Asparagine wurden (analog zu den am $\alpha\beta$ ENaC durchgeführten Experimenten) mittels zielgerichteter Mutagenese durch Alanine ersetzt. Da sich die Aminosäuresequenz der beiden Isoformen δ 1 und δ 2 ausschließlich in ihrem N-Terminus unterscheidet (Giraldez 2012), die Sequenz der Extrazellulären Domäne - ebenso wie der SK-Effekt (vgl. Abb. 26) - jedoch bei beiden Kanälen identisch ist, wurden die Experimente lediglich an der δ 1-

Untereinheit durchgeführt. Die mutierten $\delta 1$ -Untereinheiten wurden jeweils in Kombination mit der β - und γ -Untereinheit in Oozyten exprimiert und ihr SK-Effekt (bei $0,2 \text{ dyn/cm}^2$) elektrophysiologisch charakterisiert. Als Kontrolle diente der Wildtyp $\delta 1\beta\gamma\text{ENaC}$ (Wt), welcher jeweils in Oozyten desselben Donors exprimiert wurde.

Keine der Asparagin-Mutanten zeigte eine Reduktion des SK-Effektes im Vergleich mit dem Wt (siehe Abb. 69). Die zur Kontrolle normalisierten SK-Effekte der Mutanten sind in Tab. 25 aufgeführt.

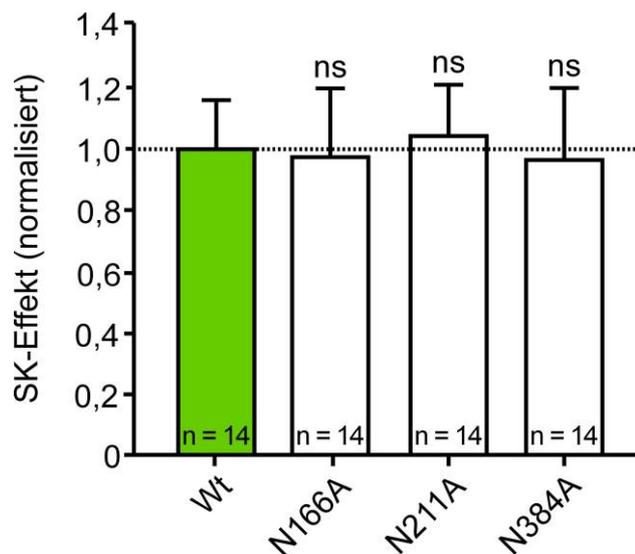


Abb. 69: Der SK-induzierte Aktivierung des $\delta 1\text{ENaC}$ wird durch die Mutation potenzieller Glykosylierungsstellen nicht beeinflusst

Die Substitution der Asparagine N166, N211 und N384 gegen Alanine (A) innerhalb der Extrazellulären Domäne der $\delta 1\text{ENaC}$ -Untereinheit reduzierte die SK-induzierte Aktivierung des $\delta 1\beta\gamma\text{ENaC}$ nicht. Die Normalisierung erfolgte, indem die jeweils durch Scherkräfte hervorgerufene prozentuale Aktivierung (SK-Effekt) der Mutante zum SK-Effekt des Wildtyps (exprimiert in Oozyten desselben Batches) ins Verhältnis gesetzt wurde ($\text{SK-Effekt}_{(\text{Mut})} / \text{SK-Effekt}_{(\text{Wt})}$). ns (nicht signifikant): $p \geq 0,05$, bezieht sich jeweils auf den SK-Effekt des Wildtyps (Wt).

Tab. 25: Normalisierte SK-Effekte der $\delta 1\text{ENaC}$ -Asparagin-Mutanten

Mutante	SK-Effekt (normalisiert)	Anzahl	Signifikanz
N166A	$0,97 \pm 0,2$	$n = 14; N = 3;$	$p = 0,9$
N211A	$1,04 \pm 0,2$	$n = 14; N = 3;$	$p = 0,8$
N384A	$0,96 \pm 0,2$	$n = 14; N = 3;$	$p = 0,9$

p bezieht sich jeweils auf den SK-Effekt des Wildtyps, der in Oozyten desselben Donors exprimiert wurde (Kontrolle).

Die Tatsache, dass weder das Degradieren von Komponenten der Extrazellulären Matrix (vgl. Abb. 41), noch die zielgerichtete Entfernung potentieller Glykosylierungsstellen, bzw. Verknüpfungspunkte zu einer Reduktion des SK-Effekts des $\delta\beta\gamma\text{ENaC}$ führte (vgl. Abb. 69), lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Wahrnehmung von SK beim $\delta\beta\gamma\text{ENaC}$ nicht über eine Verankerung innerhalb der Extrazellulären Matrix erfolgt. Diese Hypothese wurde zusätzlich

durch die Erstellung eines Homologie-Modells der Protein-Struktur gestützt. Dieses zeigte, dass alle drei mutmaßlich glykosylierten Asparagine der δ 1ENaC-Untereinheit im Inneren des Proteins lokalisiert sind (siehe Abb. 70) und daher nicht als Anknüpfungspunkte zur Extrazellulären Matrix dienen können.

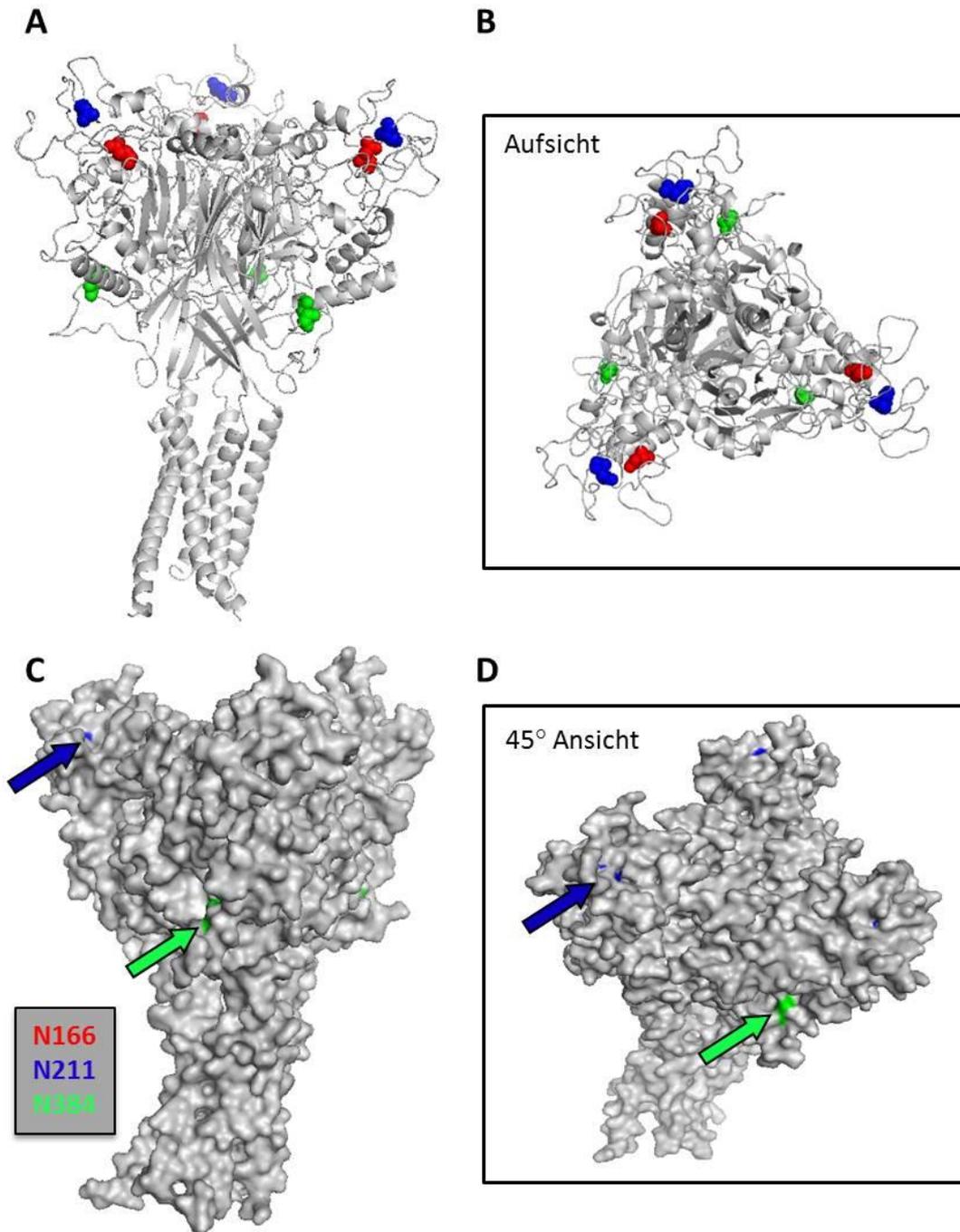


Abb. 70: Homologie-Modell eines δ 1ENaC-Trimers

A, B Cartoon-Darstellung der theoretischen Struktur eines homomeren δ 1ENaC-Trimers. Die Asparagine N166 (rot), N211 (blau) und N384 (grün) wurden als Kalotten-Modell hervorgehoben. **C, D** Oberflächenstruktur des δ 1ENaC-Homotrimers. Alle drei Asparagine (durch Pfeile, blau für N211, bzw. grün für N384, markiert) sind im Inneren des Proteins lokalisiert.

IV Diskussion

1 Der ENaC als Mechanosensor

Seit dem Jahr 2001 wird Scherkraft (SK) als adäquater Reiz zur mechanischen Aktivierung des ENaC angesehen (Satlin *et al.* 2001). Die Mechanosensitivität dieses Ionenkanals wurde seither sowohl in exogenen Expressionssystemen für ENaC-Orthologe verschiedenster Spezies (u.a. des Krallenfrosches *Xenopus laevis*, der Maus, Ratte und des Menschen), als auch in nativen Geweben (wie den Nierentubuli oder dem kortikalen Sammelrohr der Niere) bestätigt (Carattino *et al.* 2004; Morimoto *et al.* 2006; Althaus *et al.* 2007; Fronius *et al.* 2010; Abi-Antoun *et al.* 2011; Shi *et al.* 2013). SK gilt seither als konservierter, nicht-hormonaler und schneller Regulationsmechanismus des ENaC (Morimoto *et al.* 2006; Fronius und Clauss 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde die SK-vermittelte Aktivierung des humanen ENaC in den Konfigurationen $\alpha\beta\gamma$ und $\delta 1/\delta 2\beta\gamma$ verifiziert. Die eingehende Charakterisierung des SK-Effektes demonstrierte, dass die mechanische Aktivierung beider Kanäle unmittelbar, reversibel und repetitiv erfolgte. Scherkräfte in physiologisch relevanten Größenordnungen, wie sie beispielsweise in den Nierentubuli (0,06 bis 0,3 dyn/cm²; Cai *et al.* 2000; Grabias & Konstantopoulos 2013), im kortikalen Sammelrohr der Niere, kleineren Arterien und Venen (mindestens 0,2 dyn/cm²; Franke *et al.* 1984; Cai *et al.* 2000; Nauli *et al.* 2006), sowie der Lunge (0,4 bis 2 dyn/cm²; Tarran *et al.* 2006) auftreten, resultierten zudem in einer dosisabhängigen Aktivierung beider Kanäle. Diese Befunde belegen, dass der ENaC (sowohl $\alpha\beta\gamma$ als auch $\delta 1/\delta 2\beta\gamma$) als Mechanosensor in der Lage ist, zwischen verschiedenen Fließgeschwindigkeiten der Körperflüssigkeiten zu differenzieren und unmittelbar mit einer adäquaten Anpassung seiner Aktivität, d.h. mit einer Veränderung der Na⁺-Transportrate, darauf zu reagieren.

Bislang war jedoch der Mechanismus, welcher der SK-Detektion durch den ENaC zu Grunde liegt, nicht bekannt (Fronius und Clauss 2008; Shi *et al.* 2013). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte dieser molekulare Mechanismus - zumindest für den $\alpha\beta\gamma$ ENaC - erstmals aufgeklärt werden. Um die Bedeutung dieser Erkenntnisse anhand bereits publizierter Fakten beurteilen, bewerten und ausführlich diskutieren zu können, soll im Folgenden zunächst auf die molekulare Struktur des ENaC, sowie dessen *gating*-Maschinerie eingegangen werden.

2 Der molekulare Aufbau des ENaC

2.1 Die Stöchiometrie des ENaC

Bislang sind vier verschiedene Untereinheiten des humanen ENaC bekannt: α , β , γ und δ . Jede Untereinheit wird von einem separaten Gen codiert (Canessa *et al.* 1993; Canessa *et al.* 1994; Giraldez 2012), besteht aus \sim 650 bis 700 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 80 bis 95 kDa auf (Garty und Palmer 1997). Die einzelnen Untereinheiten besitzen zueinander eine Sequenzhomologie von \sim 35 % (Canessa *et al.* 1993; Canessa *et al.* 1994; Waldmann *et al.* 1995).

Da der ENaC bisher kristallographisch nicht dargestellt werden konnte, wird über seine genaue Stöchiometrie bis heute kontrovers diskutiert (Kellenberger und Schild 2015). So wurde beispielsweise von Firsov *et al.* ein heterotetramerer Aufbau vorgeschlagen, bei dem sich je 2 α - mit je einer β - und γ -Untereinheit zusammenlagern (Firsov 1998). Andere Arbeitsgruppen schlugen hingegen oktamere (Eskandari *et al.* 1999) oder nonamere (Snyder *et al.* 1998) Strukturen als Modell vor. Im Jahre 2007 gelang es der Arbeitsgruppe um Jasti *et al.* erstmals, einen zum ENaC homologen Ionenkanal - den ASIC1 - mittels Röntgenstrukturanalyse darzustellen. Für diesen wurde eine Struktur aus drei Untereinheiten postuliert, die eine zentrale Pore formen (Jasti *et al.* 2007). Bedingt durch die familiäre Verwandtschaft zum ASIC wird seitdem angenommen, dass es sich auch beim ENaC um einen heterotrimeren Kanal handelt (Canessa 2007). Für eine endgültige Bestätigung dieses Dogmas wird allerdings bis *dato* ein zuverlässiger experimenteller Nachweis benötigt (Kellenberger und Schild 2015).

Sicher ist jedoch, dass drei Untereinheiten in Kombination nötig sind (α oder δ , jeweils mit β und γ), um eine maximale Kanalaktivität und damit Na^+ -Transportrate zu erreichen (Canessa *et al.* 1994; Waldmann *et al.* 1995). Während die β - und γ -Untereinheit als akzessorische Untereinheiten betrachtet werden (Canessa *et al.* 1994; Konstas und Korbmacher 2003; Giraldez *et al.* 2007), gelten sowohl die α -, als auch die δ -Untereinheit als porenformende Untereinheiten, die zur Bildung eines funktionellen Kanals notwendig sind (Canessa *et al.* 1994; Waldmann *et al.* 1995). Beide vermitteln jedoch jeweils spezifische Kanal-Eigenschaften. So zeigt der heterolog exprimierte $\delta\beta\gamma$ ENaC deutliche funktionelle Unterschiede im Vergleich zum $\alpha\beta\gamma$ ENaC. Diese betreffen nicht nur die Leitfähigkeit, Ionenselektivität und Offenwahrscheinlichkeit, sondern auch die Selektivität gegenüber Amilorid und Protonen (Giraldez 2012). Zudem wurde die Expression der α -Untereinheit vorwiegend in Na^+ -resorbierenden Epithelien (z.B. der Niere und Lunge) nachgewiesen, während die δ -Untereinheit überwiegend in Geweben detektiert wurde, die nicht direkt mit einer Na^+ -

Resorption in Verbindung gebracht werden (Giraldez 2012). Zu diesen Geweben zählen Herz, Pankreas, Leber, Gehirn, Gonaden und Thymus, aber auch Bereiche des Magens und der Speiseröhre, sowie des Skelettmuskelgewebes (Giraldez 2012).

2.2 Die Topologie der ENaC-Untereinheiten

Jede ENaC-Untereinheit ist durch kurze intrazelluläre N- und C-Termini, zwei hydrophobe Transmembrandomänen (TM1 + 2) und eine große Extrazelluläre Domäne charakterisiert, welche ca. 70 % des gesamten Proteins ausmacht (Kashlan und Kleyman 2011). Die vorhergesagte 3D-Struktur des ENaC basiert auf der Kristallstruktur des zum ENaC homologen ASIC1 des Huhns. Demnach ähnelt jede Untereinheit einem Unterarm mit einer geballten Hand, die einen Ball umschließt (Jasti *et al.* 2007; Kellenberger und Schild 2015). Der Unterarm entspricht in diesem Modell dem transmembranären Part, während die sog. *Wrist*-Domäne (engl. für: Handgelenk) die Verbindung zwischen den Transmembran-Domänen und der Extrazellulären Domäne repräsentiert. Dementsprechend stellt die Extrazelluläre Domäne selbst die Hand dar und wird in die Sub-Domänen *palm* (Handfläche), *knuckle* (Knöchel), *finger* (Finger), β -*ball* (Ball), und *thumb* (Daumen) eingeteilt (siehe Abb. 71).

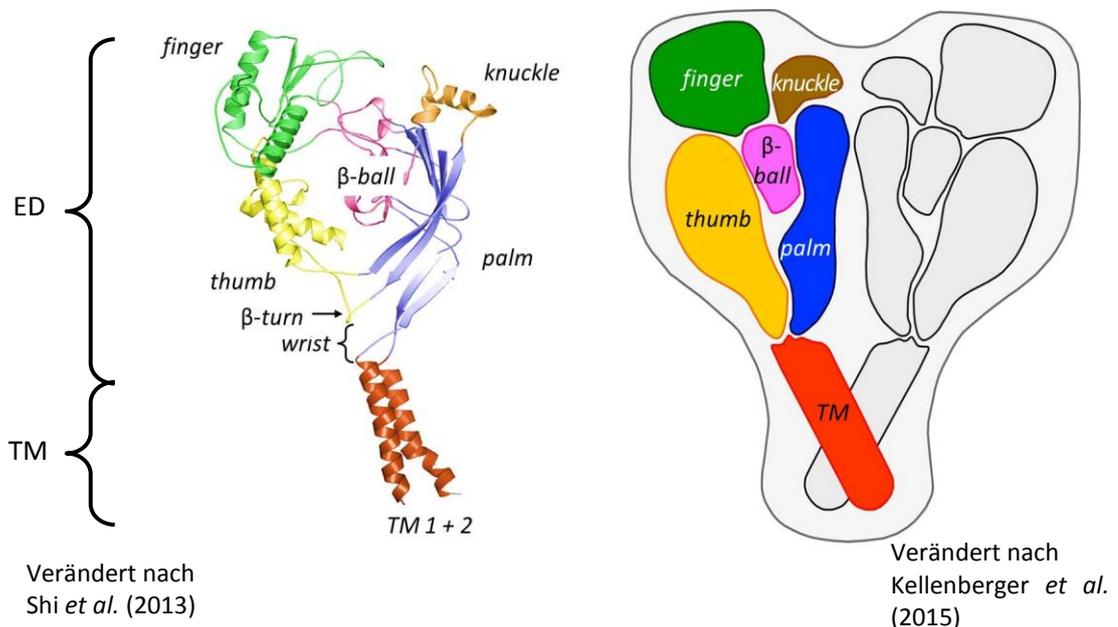


Abb. 71: Homologie-Modell der α ENaC-Untereinheit

A Das abgebildete Modell des α ENaC basiert auf der Struktur des ASIC1. Die Extrazelluläre Domäne (ED) wird in die Sub-Domänen *wrist*, *palm* (blau), *knuckle* (orange), β -*ball* (pink), *finger* (grün) und *thumb* (gelb) eingeteilt. Über den β -*turn* und die *wrist*-Domäne kann die ED mit den Transmembrandomänen (TM, rot) interagieren. Abbildung modifiziert nach Shi *et al.* 2013. **B** Schematische Darstellung des α ENaC innerhalb der Proteinstruktur. Die Farbgebung entspricht derjenigen in Abb. A. Aus Vereinfachungsgründen wurde die γ -Untereinheit lediglich in grau dargestellt, die β -Untereinheit befindet sich im Hintergrund. Darstellung verändert nach Kellenberger und Schild 2015.

Die *palm*-Domänen jeder Untereinheit werden durch β -Faltblatt-Strukturen gebildet, welche entlang der zentralen vertikalen Achse des Kanals orientiert sind und somit den Kern der Extrazellulären Domäne darstellen (Jasti *et al.* 2007; Kellenberger und Schild 2015). Die *knuckle*- und β -*ball*-Domäne sind oberhalb der *palm*-Domäne, ebenfalls nahe der vertikalen Achse lokalisiert, während die *finger*- und *thumb*-Domäne zur Außenseite des Proteins hin orientiert sind (Jasti *et al.* 2007; Kellenberger und Schild 2015; vgl. Abb. 71). Dabei bildet die *finger*-Domäne den obersten Rand des Proteins. Die *thumb*-Domäne hingegen - eine starre Struktur, gebildet aus zwei α -Helices und durch zahlreiche Disulfidbrücken stabilisiert - ist unterhalb der *finger*-Domäne angeordnet und über zwei *loops* mit dem unteren Ende der *palm*-Domäne verbunden (Jasti *et al.* 2007; Kellenberger und Schild 2015). Einer dieser *loops* interagiert über ein als β -*turn* bezeichnetes Strukturelement mit dem oberen Ende der ersten Transmembrandomäne (TM1) (Shi *et al.* 2013).

Bei Zusammenlagerung von drei ENaC-Untereinheiten formen die zweiten Transmembrandomänen (TM2) jeder Untereinheit die Kanalpore des ENaC. Hierbei bildet die engste Stelle den Selektivitätsfilter, welcher es ausschließlich kleinen Kationen - wie Na^+ , Li^+ oder H^+ - erlaubt, die Pore zu passieren (Alvarez de la Rosa *et al.* 2000). Die Verbindung zwischen der Kanalpore und den Extrazellulären Domänen - und damit der „Vorhof“ des Kanals - wird durch die hydrophoben Pre-M2 Segmente der Untereinheiten gebildet (Snyder *et al.* 1999).

2.2.1 Die Extrazellulären Domänen

Den Extrazellulären Domänen fällt eine essentielle Rolle bei der Regulation der Kanal-Aktivität zu (Kellenberger und Schild 2002; Kashlan und Kleyman 2011). So sind in der Extrazellulären Domäne der α und γ - Untereinheit spezifische Schnittstellen (*cleavage sites*) für Proteasen lokalisiert, über deren *cleavage* eine Erhöhung der ENaC-Aktivität vermittelt wird (Kleyman *et al.* 2009; Shi *et al.* 2013). Zudem sind die Extrazellulären Domänen mitunter erheblichen Veränderungen des umgebenden Milieus ausgesetzt (Collier *et al.* 2012). Dies betrifft u.a. Schwankungen des pH-Wertes oder Konzentrationsunterschieden diverser Elektrolyte, beispielsweise von Metallkationen (z.B. Zn^{2+} oder Ni^{2+}) Cl^- oder Na^+ (Collier 2011, Collier *et al.* 2014). All diese Faktoren sind dafür bekannt, die Aktivität des ENaC über eine Interaktion mit den Extrazellulären Domänen zu beeinflussen (Sheng *et al.* 2003, 2004; Cucu *et al.* 2005; Collier und Snyder 2009; Collier und Snyder 2011). Die Extrazellulären Domänen sind aber auch variierenden mechanischen Reizen unmittelbar ausgesetzt, wie z.B. dem rhythmischen Blutstrom im vaskulären System oder Variationen der Fließgeschwindigkeit des Primärharns in der Niere. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass den

Extrazellulären Domänen eine Rolle als „Scherkraft-Sensoren“ nachgesagt wird, die auftretende Variationen der Fließgeschwindigkeit detektieren und auf die Porenregion übertragen könnten (Fronius und Clauss 2008).

2.3 Die Beeinflussung des *gatings* durch SK

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Sub-Domänen der Extrazellulären Domäne des murinen ENaC ermittelt, die unmittelbar in dessen SK-vermittelte Aktivierung involviert sind. So wurde beispielsweise innerhalb der *finger*-Domäne der α -Untereinheit ein als „*flap*“ bezeichneter Bereich identifiziert. Dieser besteht aus einem kleinen anti-parallelen β -Faltblatt, das mit einem α -helikalen Bereich verbunden ist (Kashlan *et al.* 2011; Shi *et al.* 2012a; Shi *et al.* 2013). Die Substitution einzelner Aminosäuren innerhalb dieser Struktur führte ebenso wie die totale Deletion des β -Faltblatts zu einer beeinträchtigten, bzw. verzögerten Reaktion dieser Kanäle auf Scherkraft. Dies legte die Vermutung nahe, dass dieser „*flap*“ innerhalb der *finger*-Domäne am SK-Effekt partizipiert (Shi *et al.* 2012a). Ebenfalls wurde eine Beteiligung des β -turns und der *wrist*-Domäne, aber auch der *pre-M2* Segmente und der TM2 aller drei ENaC-Untereinheiten am SK-Effekt über das Einfügen von zielgerichteten Mutationen nachgewiesen (Carattino *et al.* 2005; Abi-Antoun *et al.* 2011; Shi *et al.* 2011; Shi *et al.* 2012a; Shi *et al.* 2012b; Shi *et al.* 2013).

Daraufhin wurde folgendes Modell zur Beeinflussung des *gating* durch SK vorgeschlagen: SK löst mutmaßlich eine Konformationsänderung innerhalb der Extrazellulären Domänen aus (vgl. Abb. 72A, B). Diese Konformationsänderung wird über die *wrist*-Domäne, die *pre-M2* Segmente und den β -turn auf die Transmembrandomänen übertragen und induziert daraufhin deren Rotation. Auf diese Weise kommt es zu einer Aktivierung des Kanals (Tolino *et al.* 2011; Eastwood und Goodman 2012; Shi *et al.* 2012a; Shi *et al.* 2013; Baconguis *et al.* 2014; vgl. Abb. 72C).

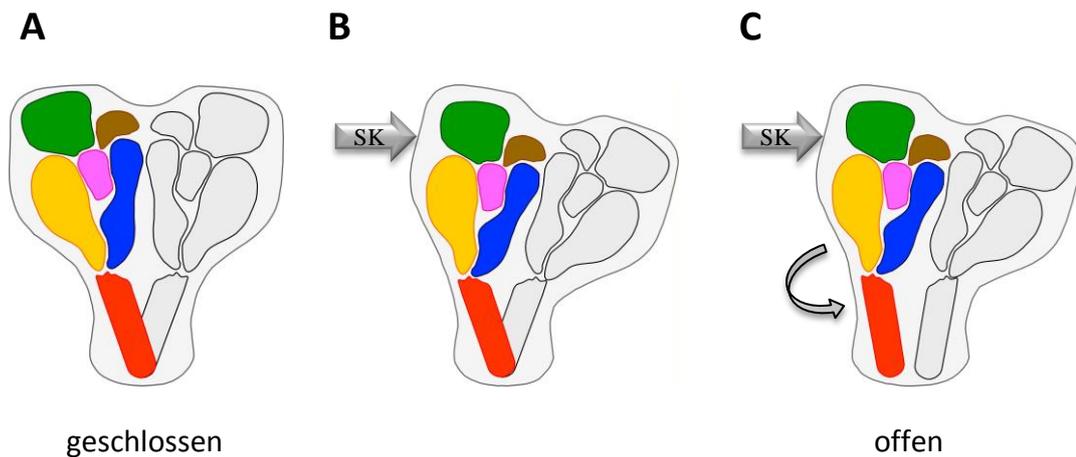


Abb. 72: Modell zur Scherkraft-induzierten Beeinflussung des ENaC-gatings

A Der ENaC im geschlossenen Zustand. **B** Das Auftreten von SK induziert eine Auslenkung der Extrazellulären Domänen. Diese Auslenkung wird auf die Transmembrandomänen übertragen, wodurch der Kanal geöffnet wird (**C**).

Bislang war jedoch nicht bekannt, wie genau der initiale mechanische Stimulus durch den ENaC detektiert wird (Kashlan und Kleyman 2011; Eastwood und Goodman 2012; Shi *et al.* 2013). Eine Hypothese, wie der ENaC SK wahrnehmen könnte, liefert das sog. *tethered* Modell. Dieses beschreibt, dass mechanosensitive Ionenkanäle über eine elastische Verknüpfung mit Komponenten der Extrazellulären Matrix verbunden sind. Gemäß diesem Modell würde das Einwirken von SK zu einer Verschiebung der Extrazellulären Matrix führen. Diese Auslenkung würde wiederum über die Verknüpfung auf den Ionenkanal übertragen und in dessen Aktivierung resultieren (Eastwood und Goodman 2012; Zanini und Göpfert 2013). Die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Erkenntnisse zum Einfluss der Extrazellulären Matrix auf den SK-Effekt des ENaC sollen im Folgenden diskutiert werden.

3 Die Extrazelluläre Matrix als SK-Sensor

Die Extrazelluläre Matrix ist derjenige Anteil tierischen Gewebes, welcher zwischen den Zellen im Interzellularraum lokalisiert ist (Alberts *et al.* 2002; Frantz *et al.* 2010). Die einzelnen Bestandteile der Extrazellulären Matrix werden von den Zellen gebildet und mittels Exozytose sezerniert. Die neu synthetisierten und sezernierten Komponenten verbinden sich daraufhin mit der bereits vorhandenen Matrix (Alberts *et al.* 2002; Hubbard *et al.* 2012; Gao *et al.* 2014). Grundsätzlich besteht die Extrazelluläre Matrix aus verschiedenen Komponenten in veränderlichen Mengenanteilen: Proteinen (z. B. Kollagen und Elastin), Polysacchariden, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen (z.B. Hyaluronsäure). Diese bilden ein komplexes und dynamisches Netzwerk aus Makromolekülen, das neben der Formgebung und Elastizität

von Geweben auch der Wahrnehmung und Transduktion von Reizen dient (Alberts *et al.* 2002; Kim *et al.* 2011). Insbesondere die Detektion mechanischer Stimuli (Dehnung oder SK) erfolgt durch die Extrazelluläre Matrix (Kim *et al.* 2011; Fu und Tarbell 2013). Diese mechanischen Reize werden beispielsweise über eine Verknüpfung mit speziellen, in der Membran eingelagerten Proteinen (Integrinen) ins Zellinnere übertragen (Kim *et al.* 2011). In diesem Zusammenhang wurde am Nematoden *Caenorhabditis elegans* gezeigt, dass die Aktivierung eines Mechanosensors – der aus zum ENaC homologen Proteinen aufgebaut ist – über eine Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix erfolgt. Es wird daher gemäß dem *tethered* Modell angenommen, dass eine durch Dehnung hervorgerufene Verformung der Extrazellulären Matrix auf diesen Kanal übertragen wird und so zu dessen Öffnung führt (Bounoutas und Chalfie 2007; Bianchi 2007).

Einen Nachweis über eine Verbindung zwischen der Extrazellulären Matrix und dem ENaC gibt es bisher nicht. Jedoch wird beispielsweise der endothelialen Glykokalyx (der Extrazellulären Matrix von Endothelzellen) eine bedeutende Rolle als Mechanosensor zugeschrieben (Weinbaum *et al.* 2003; Fu und Tarbell 2013). Diese 0,1 bis 1 μm dicke Glykokalyx ist der innersten Zellschicht aller Blutgefäße aufgelagert – den Endothelzellen. Eine Expression funktioneller ENaCs in der luminalen (d.h. der dem Blut zugewandten) Membran, sowie ihre potentielle Rolle als SK-Sensoren in diesen Zellen wurde ebenfalls bereits beschrieben (Drummond *et al.* 2004; Wang *et al.* 2009; Kusche-Vihrog *et al.* 2010; Warnock 2013; Kusche-Vihrog *et al.* 2014a; Kusche-Vihrog *et al.* 2014b). Betrachtet man jedoch den Querschnitt eines Blutgefäßes genauer, wird deutlich, dass der ENaC von dem dichten Geflecht der Glykokalyx vollständig überdeckt werden würde (Abb. 73).

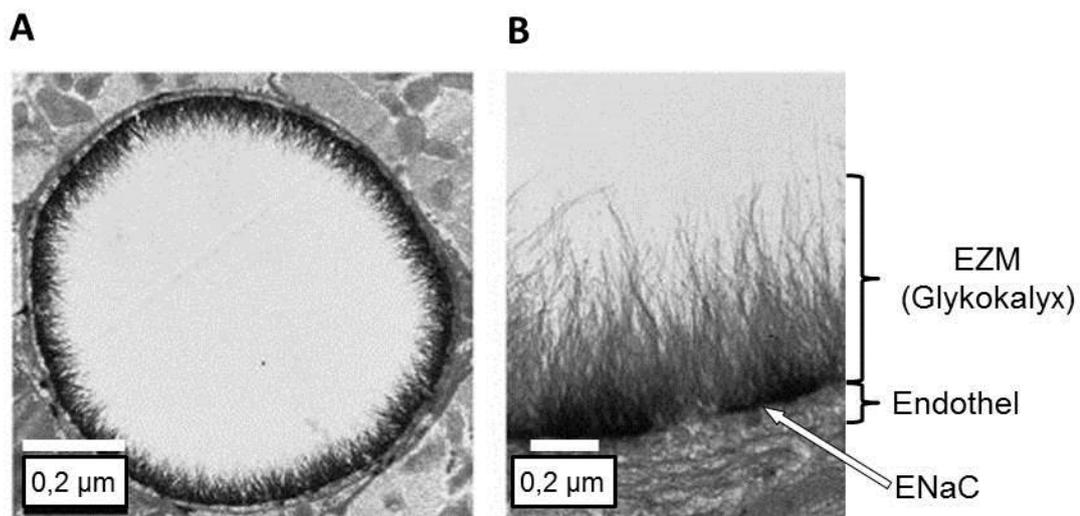


Abb. 73: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der endothelialen Glykokalyx

A Die REM-Aufnahmen zeigen den Querschnitt durch eine Koronararterie, sowie eine Vergrößerung daraus (**B**). Die Glykokalyx, eine spezialisierte Form der Extrazellulären Matrix (EZM), bildet ein auf die Innerste Zellschicht (Endothel) aufgelagertes Geflecht. Der ENaC (dessen hypothetische Lokalisation durch den weißen Pfeil symbolisiert wird) befindet sich in der luminalen Membran - überdeckt von der Glykokalyx. Abbildung entnommen aus und verändert nach Nieuwdorp *et al.* 2005).

Eine direkte SK-Wahrnehmung des ENaC unterhalb der Extrazellulären Matrix (Glykokalyx) scheint daher ohne eine Verknüpfung zu ihr nahezu ausgeschlossen. Anhand dieses Beispiels wird deutlich, warum in Übereinstimmung mit dem bereits vorgestellten *tethered Modell* die Hypothese formuliert wurde, dass der ENaC vermutlich über die Extrazellulären Domänen in der Extrazellulären Matrix verankert ist und dass solch eine Verknüpfung für die Wahrnehmung von SK essentiell ist.

4 Die Beteiligung der Extrazellulären Matrix am SK-Effekt des ENaC

Da die Beteiligung der Extrazellulären Matrix an der Mechanosensitivität des ENaC durch heterologe Expression des Kanals in *Xenopus* Oozyten untersucht wurde, wurde zunächst der strukturelle Aufbau dieser speziellen Extrazellulären Matrix überprüft.

4.1 Die Extrazelluläre Matrix von *Xenopus* Oozyten

In Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien (Larabell 1988; Hedrick und Nishihara 1991) und in der vorliegenden Arbeit mittels Rastelektronenmikroskopie bestätigt (vgl. Abb. 6), besteht die Extrazelluläre Matrix von *Xenopus* Oozyten aus zwei unterschiedlichen Kompartimenten:

- 1) Die ca. 1 µm dicke **Vitellinhülle** besteht zu 85 % aus Proteinen und zu 15 % aus Kohlenhydraten (Wolf *et al.* 1976; Larabell 1988) und ist durch ein dichtes Geflecht aus Filamenten charakterisiert, die alternierend in Bündeln oder Schichten angeordnet sind (Grey *et al.* 1974; Larabell 1988). Die Vitellinhülle dient der Oozyte zum einen als Exoskelett, das ihr Formstabilität verleiht (Wolf *et al.* 1976), zum anderen als Schutz vor Polyspermie – da sich ihre molekulare Zusammensetzung nach der Befruchtung dahingehend ändert, dass sie für weitere Spermien undurchdringbar wird (Barisone *et al.* 2007). Da die Vitellinhülle durch zahlreiche Poren von variablem Durchmesser durchbrochen wird (Larabell und Chandler 1989), ist sie für alle essentiellen Substrate der Oozyte penetrabel und stellt keinen elektrischen Widerstand dar (Dascal 1987; Althaus 2006).
- 2) Der **Perivitelline Spalt** – ebenfalls ca. 1 µm dick – bildet den Übergang zwischen der Zellmembran der Oozyte (welche durch zahlreiche, in den perivitellinen Spalt hineinragende Mikrovilli gekennzeichnet ist) und der darüber liegenden Vitellinhülle.

Obwohl der Name etwas anderes impliziert, handelt es sich hier nicht um einen ungefüllten Zwischenraum (Hedrick und Nishihara 1991) – der Spalt enthält stattdessen ein Glykokalyx-ähnliches, dichtes und filamentöses Geflecht von Fasern (Larabell 1988). Diese vernetzen die oberen Spitzen der Mikrovilli mit der Oberfläche der Oozyte, verknüpfen die Mikrovilli untereinander, interagieren jedoch auch mit Fasern innerhalb der Vitellinhülle (Larabell 1988; Hedrick und Nishihara 1991).

4.2 Der Einfluss der Vitellinhülle auf den SK-Effekt

Um den Einfluss der Vitellinhülle an der SK-Detektion des ENaC zu bestimmen, wurde diese unmittelbar vor der Messung mechanisch entfernt. Als Kontrolle dienten jeweils Oozyten mit intakter Vitellinhülle. Weder bei $\alpha\beta\gamma$ -, noch bei $\delta 1/\delta 2\beta\gamma$ ENaC-exprimierenden Oozyten hatte die Devitellinisierung eine Beeinflussung des SK-Effektes zur Folge (vgl. Abb. 37). Hiermit wurden die Ergebnisse von Althaus *et al.* betätigt, die eine Beteiligung der Vitellinhülle am SK-Effekt der ENaC-Orthologe von *X. laevis* und der Ratte ausschlossen (Althaus et al. 2007).

Dieses Resultat impliziert nun zwei Dinge:

- 1) Die SK-Wahrnehmung des humanen ENaC erfolgt nicht über eine Verbindung zur Vitellinhülle. Wenn man sich die durch unzählige Mikrovilli gekennzeichnete Oberflächenstruktur der Oozyte in Erinnerung ruft, wäre es auch äußerst unwahrscheinlich, dass der ENaC – wenn er z.B. in den Vertiefungen oder an der lateralen Seite der Mikrovilli lokalisiert ist – überhaupt direkt mit der Vitellinhülle in Kontakt kommt.
- 2) Sollte die mechanische Aktivierung des ENaC über eine Verbindung zur Extrazellulären Matrix erfolgen, dann müssen die mit dem ENaC verknüpften Komponenten der Extrazellulären Matrix innerhalb des perivitellinen Spaltes lokalisiert sein.

Um die Komponenten innerhalb des perivitellinen Spaltes zu degradieren, wurden spezielle Enzyme eingesetzt, welche gegen Hauptbestandteile der Extrazellulären Matrix gerichtet waren.

4.3 Elastin ist nicht an der SK-Wahrnehmung des ENaC beteiligt

Kollagen und Elastin bilden die bedeutendsten Strukturproteine in nahezu jeder Extrazellulären Matrix (Kielty *et al.* 2002; Kim *et al.* 2011). Da Kollagen in der Extrazellulären Matrix von Frosch-Oozyten nicht vorhanden ist (Hedrick und Nishihara 1991), wurde sich auf Elastin als dasjenige Strukturprotein fokussiert, welches als möglicher Interaktionspartner an der SK-Wahrnehmung des ENaC in Betracht käme. Eine Beteiligung von Elastin an der Transduktion mechanischer Reize auf Membranproteine ist bereits bekannt. So gilt z.B. eine Verbindung mit Elastin für den mechanosensitiven Elastin-Laminin-Rezeptor als notwendig, um mechanische Stimuli detektieren zu können (Spofford und Chilian 2001, 2003).

Ob Elastin auch an der mechanischen Aktivierung des ENaC beteiligt ist, wurde durch Degradation des Strukturproteins mittels des Enzyms Elastase überprüft. Es zeigte sich, dass der SK-Effekt durch den Abbau von Elastin nicht beeinträchtigt wurde (vgl. Abb. 38). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Elastin nicht an der Wahrnehmung und Transduktion von SK auf den ENaC beteiligt ist.

4.4 Der SK-Effekt nach Hyaluronidase-vermittelter Degradierung der Extrazellulären Matrix

Ein weiteres, ubiquitär in der tierischen Extrazellulären Matrix vorkommendes Makromolekül ist die Hyaluronsäure (Laurent und Fraser 1992; Marcellin *et al.* 2014). Auch für dieses Molekül gibt es bereits zahlreiche Nachweise für eine Beteiligung in Mechanotransduktionsprozessen (Mochizuki *et al.* 2003; Guidry *et al.* 2011; Chopra *et al.* 2014). So erfolgt beispielsweise die Detektion der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes im Gefäßsystem über eine Verknüpfung von Hyaluronsäure mit in die Zellmembran von Endothelzellen eingelagerten Integrinen (Mochizuki *et al.* 2003). Diese Verbindung ermöglicht es den Endothelzellen, essentielle Funktionen in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes zu kontrollieren, beispielsweise die Freisetzung des vasodilatorischen Transmitters Stickstoff-Monoxid (NO; Mochizuki *et al.* 2003).

Hyaluronsäure setzt sich aus 500 bis 50.000 Disacchariden zusammen, jeweils bestehend aus D-Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin (Laurent und Fraser 1992; Hokputsa *et al.* 2003). Hyaluronsäure bildet oftmals das Rückgrat (*backbone*) riesiger Proteoglykan-Aggregate (siehe Abb. 74). Beispielsweise können sich an ein einzelnes Hyaluronsäure-Molekül über spezielle *linker*-Proteine hundert oder mehr *core*-Proteine, z.B. Aggregate anlagern (Seror *et al.* 2012). An diese *core*-Proteine können wiederum zahlreiche Glykosaminyglykan-Ketten (z.B. Chondroitin- oder Keratin-Sulfat) gebunden sein (Ng *et al.* 2003). Auf Grund dessen erinnert die gesamte

Struktur solcher Proteoglykan-Aggregate an eine „Flaschenbürste“ (Ng *et al.* 2003, vgl. Abb. 74.)

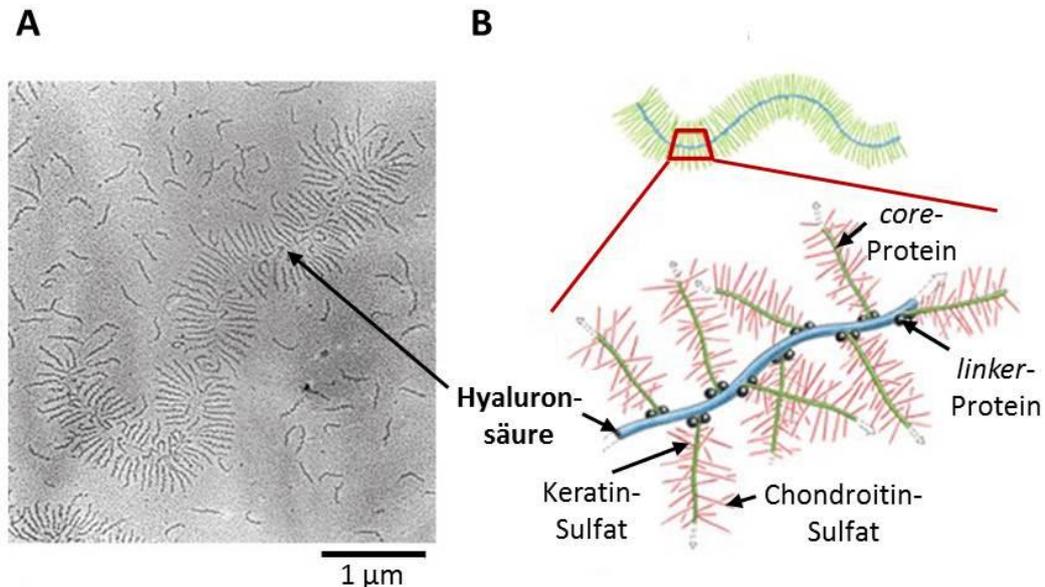


Abb. 74: Struktur eines Proteoglykan-Aggregates

A Rasterelektronenmikroskopische, sowie **B** schematische Darstellung eines Proteoglykan-Aggregates. An Hyaluronsäure, welches als Rückgrat (*backbone*) dient, sind über spezielle *linker*-Proteine die sogenannten *core*-Proteine angeheftet, welche ihrerseits zahlreiche Glykosaminglykan-Ketten (Keratin- und Chondroitin-Sulfat) tragen. Entnommen aus und verändert nach (Alberts *et al.* 2002).

Zur Degradation der Hyaluronsäure wurde das Enzym Hyaluronidase verwendet. Diese Endoglykosidase zerschneidet die $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidische Bindung zwischen D-Glukuronsäure und N-Acetylglucosamin und sollte dementsprechend über die Zerstörung des *backbones* eine effektive Degradierung der Extrazellulären Matrix erzielen. Die Fähigkeit von Hyaluronidase, Komponenten der Extrazellulären Matrix innerhalb des Perivitellinen Spaltes von *Xenopus* Oozyten zu degradieren, wird sich in der elektrophysiologischen Forschung bereits seit einigen Jahren zunutze gemacht. So ist bekannt, dass die vorherige Inkubation in Hyaluronidase das Ablösen der Vitellinhülle von der Membran – wie es im Vorfeld von *Patch Clamp* Messungen notwendig ist – stark vereinfacht. Dies ist darin begründet, dass Hyaluronidase die verknüpfenden Filamente zwischen Membran und Vitellinhülle degradiert (Choe und Sackin 1997).

4.4.1 Der Effekt von Hyaluronidase auf die Mechanosensitivität des $\alpha\beta\gamma$ ENaC

Der SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC war nach Inkubation devitellinierter Oozyten in Hyaluronidase reduziert (vgl. Abb. 40). Dieser Befund lieferte erstmalig einen Hinweis darauf, dass die

Extrazelluläre Matrix für den $\alpha\beta\gamma$ ENaC – zumindest im *in vitro* Expressionssystem – notwendig ist, um SK detektieren zu können. Diese Annahme bestätigte sich auch anhand der Experimente, in denen Hyaluronidase unmittelbar auf $\alpha\beta\gamma$ ENaC-exprimierende Oozyten appliziert wurde (vgl. Abb. 43). Die Zugabe des Enzyms verursachte hier eine unmittelbare Abnahme des Stromes. Da Hyaluronidase lediglich endoglykosidische, jedoch keine proteolytische Aktivität besitzt (Menzel und Farr 1998) und auch im Western Blot keine Degradation des α ENaC nach Hyaluronidase-Behandlung sichtbar war (vgl. Abb. 63), kann eine Beeinflussung der ENaC-Aktivität über eine proteolytische Spaltung des Kanals ausgeschlossen werden. Der Umstand, dass die durch Hyaluronidase verursachte Stromabnahme sich in ihrem Ausmaß nicht von derjenigen unterschied, die durch das Stoppen der Perfusion verursacht wurde (vgl. Abb. 43), spricht ebenso wie der ausbleibende Effekt von Hyaluronidase in Abwesenheit von SK (Abb. 45) für folgendes Szenario: Hyaluronidase degradiert die mit dem $\alpha\beta\gamma$ ENaC verbundenen Komponente(n) der Extrazellulären Matrix oder die Verbindung zu ihnen. Durch den Verlust dieser Verbindung kann der Kanal SK nicht mehr wahrnehmen, so dass er in seiner Aktivität gehemmt wird.

In Übereinstimmung mit dieser Annahme führte auch die Applikation von SK in Anwesenheit von Hyaluronidase zu einem signifikant reduzierten SK-Effekt im Vergleich zur Kontrolle (ohne Hyaluronidase, vgl. Abb. 43). Da Hyaluronidase die Vitellinhülle nicht degradieren kann (da diese nachweislich keine Hyaluronsäure enthält (Hedrick und Nishihara 1991)) und trotzdem den SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC reduzierte, wurde zudem die Hypothese bestätigt, dass die mit dem $\alpha\beta\gamma$ ENaC verknüpften, Hyaluronidase-sensitiven und für die SK-Detektion notwendigen Komponenten der Extrazellulären Matrix innerhalb des perivitellinen Spaltes lokalisiert sein müssen. Da die Filamente des perivitellinen Spaltes die Mikrovilli untereinander oder mit der Membran verknüpfen (Larabell 1988; Larabell und Chandler 1989), ist auch eine Interaktion mit Membranproteinen (wie z.B. dem ENaC) durchaus vorstellbar.

Eine Aussage über die exakte Natur der mit dem ENaC verknüpften Komponente der Extrazellulären Matrix gestaltet sich jedoch anhand der vorliegenden Daten als schwierig. Aus ihnen kann nicht mit Sicherheit abgeleitet werden, dass der $\alpha\beta\gamma$ ENaC direkt mit Hyaluronsäure interagiert. Diese Aussage basiert auf zwei Fakten: 1) Hyaluronidase schneidet nicht nur Hyaluronsäure, sondern auch unspezifisch β -N-Acetylhexosamin-glykosidische Bindungen in Chondroitin und Chondroitin-Sulfaten (Menzel und Farr 1998; Lokeshwar *et al.* 2002). Daher kämen auch diese Moleküle als mögliche Bindungspartner des $\alpha\beta\gamma$ ENaC in Betracht. 2) Die Behandlung mit Hyaluronidase bedingt zwar über die Zerstörung des *backbones* der Proteoglykane eine effektive Zerstörung der gesamten Struktur, dies macht im Gegenzug jedoch eine detaillierte Bestimmung der mit dem $\alpha\beta\gamma$ ENaC verknüpften

Komponente unmöglich. Hierzu wäre der Einsatz weiterer und wesentlich spezifischerer Enzyme vonnöten, beispielsweise von Chondroitinase oder Keratinase.

Es lässt sich jedoch festhalten, dass bei einem Abbau der Hyaluronsäure (durch Inkubation oder akute Zugabe von Hyaluronidase) ein verminderter SK-Effekt beobachtet wurde. Dies bestätigt eine Beteiligung der Extrazellulären Matrix an der SK-induzierten Aktivierung des $\alpha\beta\gamma$ ENaC und stellt damit einen neuartigen und bislang unbekanntem Aktivierungsmechanismus dieses wichtigen Na^+ -Kanals dar.

3.4.2 Die Mechanosensitivität des $\delta\beta\gamma$ ENaC wird nicht über Hyaluronidase-sensitive Komponenten der Extrazellulären Matrix vermittelt

Im Gegensatz zum $\alpha\beta\gamma$ ENaC reagierte der $\delta\beta\gamma$ ENaC nach Behandlung mit Hyaluronidase (sowohl nach Inkubation als auch akuter Zugabe) unverändert auf SK (vgl. Abb. 46). Daraus kann abgeleitet werden, dass der $\delta\beta\gamma$ ENaC entweder 1) SK womöglich nicht über eine Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix detektiert, oder aber 2) mit anderweitigen Komponenten der Extrazellulären Matrix verknüpft ist. Die zweite Möglichkeit könnte insofern zutreffen, als dass sich die α - und δ -Untereinheit in Bezug auf ihre Gewebsverteilung unterscheiden (Giraldez 2012). Da auch die molekulare Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix gewebsabhängig stark variiert (Frantz *et al.* 2010), könnte der δ ENaC durchaus Verknüpfungen zu alternativen und in dieser Studie nicht untersuchten Komponenten der Extrazellulären Matrix ausbilden. Zur eindeutigen Klärung, ob SK vom $\delta\beta\gamma$ ENaC über eine Verbindung zur Extrazellulären Matrix detektiert wird, wäre der Einsatz weiterer gegen Strukturbestandteile der Extrazellulären Matrix gerichteter Enzyme wie etwa Chondroitinase, Laminase oder Keratinase notwendig.

Gleichwohl kann man anhand der vergleichenden Experimente am $\alpha\beta\gamma$ -, bzw. $\delta\beta\gamma$ ENaC schlussfolgern, dass die α -Untereinheit maßgeblich an der SK-Detektion beteiligt ist. Dies erschließt sich aus dem Umstand, dass beide Kanäle nach Degradierung der Extrazellulären Matrix durch Hyaluronidase völlig gegensätzliche Reaktionen zeigten, die β - und γ -Untereinheit jedoch bei beiden Kanälen identisch war.

5 Verknüpfungspunkte zwischen ENaC und Extrazellulärer Matrix

Asparagine, die innerhalb einer bestimmten Konsensussequenz vorliegen, können über ihr Stickstoff-Atom glykosyliert werden (Snyder *et al.* 1994). Diese Sequenz umfasst das Asparagin (Asn), gefolgt von einer beliebigen Aminosäure (außer Prolin, X) und Serin (Ser) oder

Threonin (Thr) an dritter Position (Asn – X – Ser/Thr; Snyder *et al.* 1994). In der Extrazellulären Domäne der humanen α -Untereinheit des ENaC liegen fünf, in der δ -Untereinheit 3 Asparagine innerhalb dieser Konsensussequenz vor (*Uni-Prot identifier* P37088 (α) und P51172 (δ)). Diese Aminosäuren stellen potentielle Anknüpfungspunkte zur Extrazellulären Matrix dar, da ihre Zuckerketten mit Komponenten der Extrazellulären Matrix, z.B. Hyaluronsäure, verknüpft sein könnten. Um die Verknüpfungspunkte des ENaC zur Extrazellulären Matrix im Detail zu lokalisieren, wurden diese mutmaßlich glykosylierten Asparagine mittels zielgerichteter Mutagenese gegen Alanine substituiert. Anschließend wurde der SK-Effekt dieser Mutanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-ENaC (Wt) bestimmt.

5.1 Die Mechanosensitivität des $\delta\beta\gamma$ ENaC wird nicht über eine N-glykosidische Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix vermittelt

Durch das Mutieren der mutmaßlich glykosylierten Asparagine konnte für den $\delta\beta\gamma$ ENaC keine Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix nachgewiesen werden, da das Substituieren der Asparagine in keiner Beeinträchtigung des SK-Effektes resultierte (siehe Abb. 69). Die mittels *Homologie-Modelling* erstellte 3D-Struktur des δ ENaC belegte zudem, dass die Ausbildung einer Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix vermutlich nicht über diese drei Asparagine erfolgen kann, da sie sich sämtlich im Inneren der Proteinstruktur befinden (vgl. Abb. 70). Eine Verbindung dieser Asparagine zu Bestandteilen der Extrazellulären Matrix kann daher ausgeschlossen werden. In Kombination mit den nach Degradation der Extrazellulären Matrix (durch Hyaluronidase) gewonnenen Daten kann daher davon ausgegangen werden, dass der $\delta\beta\gamma$ ENaC zwar durch SK aktiviert wird, die Detektion dieses mechanischen Reizes jedoch nicht über Hyaluronsäure und/oder eine N-glykosidische Verbindung zur Extrazellulären Matrix vermittelt wird.

Nicht gänzlich auszuschließen ist hingegen, dass der $\delta\beta\gamma$ ENaC möglicherweise über eine O-Glykosylierung eine potentielle Verbindung zur Extrazellulären Matrix bildet. Eine O-Glykosylierung erfolgt über das Anheften von Zuckerketten an die Hydroxyl (OH)-Gruppe von Serin oder Threonin (Steen, *et al.* 1998). Innerhalb der Extrazellulären Domäne der δ -Untereinheit befinden sich 33 Serine und 22 Threonine (*Uni-Prot identifier* P51172) über deren mögliche O-Glykosylierung jedoch bisher nichts bekannt ist. Da zudem keine Konsensussequenz für eine O-Glykosylierung bekannt ist (Gao *et al.* 2003), käme damit jede dieser Aminosäuren als Verknüpfungsstelle in Betracht. Um eine solche Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix, sowie deren potentielle Beteiligung am SK-Effekt des $\delta\beta\gamma$ ENaC zu untersuchen, könnte man sich daher zunächst z.B. spezifisch gegen O-glykosidische Bindungen gerichteter Enzyme, wie der β -N-Acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase; Gao *et al.*

2003) bedienen. Sollte eine O-glykosidische Verbindung zur Extrazellulären Matrix für die SK-Detektion des $\delta\beta\gamma\text{ENaC}$ verantwortlich sein, dann müsste der SK-Effekt nach dieser enzymatischen Behandlung deutlich reduziert sein. Diese Fragestellung müsste jedoch in weiterführenden Studien adressiert werden.

5.2 Glykosylierte Asparagine der *knuckle* und *palm*-Domäne der α -Untereinheit sind an der SK-Detektion des $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ beteiligt.

Die Beteiligung der Asparagine N232, N294 und N397 an der SK-Wahrnehmung des $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ konnte (obwohl sämtlich an der Oberfläche des αENaC lokalisiert) ebenfalls ausgeschlossen werden, da ihre Mutation in keiner Beeinflussung des SK-Effektes resultierte (Abb. 50). Demgegenüber konnten in der vorliegenden Arbeit zwei Asparagine (N312 und N511) innerhalb der Extrazellulären Domäne der α -Untereinheit identifiziert werden, welche über ihre N-Glykosylierung die potentielle Verbindung zur Extrazellulären Matrix ausbilden und somit die strukturelle Basis für die SK-Detektion des $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ bilden. Dies erschloss sich aus dem Umstand, dass die Substitution beider Asparagine zwar weder die Abundanz der Kanäle, noch deren Einzelkanaleigenschaften (Offenwahrscheinlichkeit und Leitfähigkeit) beeinflusste (Tab. 24), jedoch sowohl in einem reduzierten Glykosylierungsstatus (vgl. Abb. 63) als auch einem verminderten SK-Effekt im Vergleich zum Wt resultierte (siehe Abb. 64). Auf Grund dieser Daten kann folgendes geschlossen werden: Die Glykosylierung dieser beiden Asparagine (N312 und N511) innerhalb der Extrazellulären Domäne der α -Untereinheit ist vermutlich ausschließlich zur Ausbildung einer Verbindung zur Extrazellulären Matrix und damit für die SK-Detektion des humanen $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ verantwortlich.

In Übereinstimmung mit der mutmaßlichen Kristallstruktur des αENaC befinden sich beide Asparagine an der Oberfläche des Proteins (siehe Abb. 60). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich das Asparagin 312 an der Außenseite der *palm*-Domäne befindet, während dasjenige an Position 511 an der Oberseite der *knuckle*-Domäne lokalisiert ist. Während für *finger*-, *thumb*- und *wrist*- ebenso wie die Transmembran-Domänen und die Porenregion bereits eine Beteiligung an der SK-vermittelten Aktivierung des ENaC nachgewiesen werden konnte (Carattino *et al.* 2005; Abi-Antoun *et al.* 2011; Shi *et al.* 2011; Shi *et al.* 2012a; Shi *et al.* 2012b; Shi *et al.* 2013), wurde eine Partizipation der *palm*- und *knuckle*-Domäne bisher nicht überprüft. Beide Domänen (*palm*- und *knuckle*) können jedoch anhand der vorliegenden Erkenntnisse als diejenigen Domänen angesehen werden, die den initialen mechanischen Stimulus detektieren.

Die vorliegenden Daten lassen sich mit dem bereits vorgestellten *tethered* Modell in Einklang bringen, weshalb nunmehr zusammenfassend von folgendem Modell für die SK-Wahrnehmung des $\alpha\beta\gamma$ ENaC ausgegangen werden kann:

Die Asparagine 312 und 511 innerhalb der Extrazellulären Domäne der α -Untereinheit sind über ihre Glykosylierung mit der Extrazellulären Matrix verbunden. Bei Auftreten von Scherkräften wird die Extrazelluläre Matrix verschoben, was wiederum über die Verankerung auf den α ENaC übertragen wird und dort eine dosisabhängige Auslenkung der *palm*- und *knuckle*-Domänen verursacht (siehe Abb. 75). Im Anschluss an diese initiale SK-Detektion wird der mechanische Stimulus vermutlich über die Konformationsänderung der Extrazellulären Domänen auf die Transmembran-Domänen und damit die Porenregion übertragen, was in Folge zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit führt.

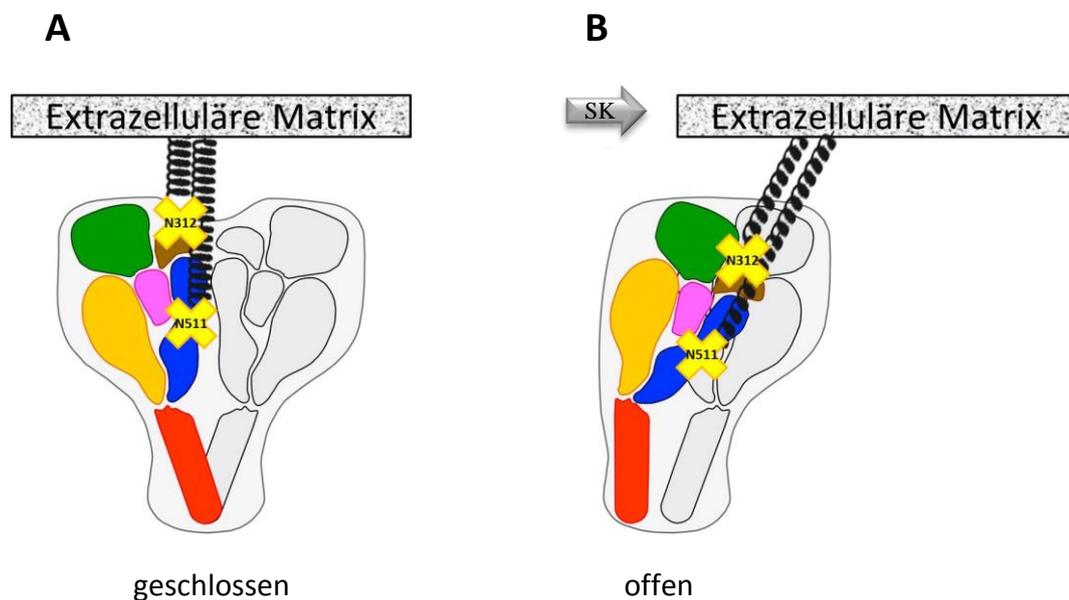


Abb. 75: Hypothetisches Modell zur SK-Detektion des $\alpha\beta\gamma$ ENaC über die Asparagine 312 und 511

Über die Glykosylierung des Asparagins 312 innerhalb der *knuckle*-Domäne (braun) und 511, das in der *palm*-Domäne (blau) lokalisiert ist, wird der durch Scherkraft (SK) verursachte, mechanische Reiz von der Extrazellulären Matrix auf die Extrazelluläre Domäne des α ENaC übertragen. Auf diese Weise wird die Konformationsänderung der ED initiiert (B), so dass in Folge eine das *gating* beeinflussende Rotation der Transmembrandomänen ausgelöst wird. Abbildung verändert nach Kellenberger und Schild 2015.

Ob durch SK allein die α -Untereinheit ausgelenkt wird, oder ob die Konformationsänderung auch β - und γ betrifft, kann anhand der vorliegenden Daten nicht bestimmt werden. Interessanterweise liegt jedoch das Asparagin an Position 312 innerhalb derjenigen Region der *palm*-Domäne, die (zumindest beim zum ENaC homologen ASIC1) bei der Zusammenlagerung von drei Untereinheit zu einem funktionellen Kanal mit der *thumb*-Domäne der benachbarten Untereinheit interagiert (Jasti *et al.* 2007). Es wird angenommen, dass über diese Region (beim ASIC1) Konformationsänderungen der einen Untereinheit auf

die *thumb*-Domäne der benachbarten Untereinheit übertragen werden (Jasti *et al.* 2007). Die *knuckle*-Domäne (innerhalb der sich das Asparagin 511 befindet) ist hingegen für ihre Interaktion mit der *finger*-Domäne der benachbarten Untereinheit bekannt (Jasti *et al.* 2007). Dies legt nahe, dass eine SK-vermittelte Auslenkung der Asparagine (N312 und N511) daher nicht nur die α -Untereinheit, sondern gleichzeitig die *thumb*- und *finger*-Domäne der benachbarten γ -Untereinheit affektieren und auf diese Weise möglicherweise ebenso zu deren Konformationsänderung beitragen könnte. Hierfür spricht zudem, dass eine Beteiligung der Extrazellulären Domänen der γ -Untereinheit am SK-Effekt des (murinen) $\alpha\beta\gamma$ ENaC bereits nachgewiesen werden konnte (Shi *et al.* 2011; Shi *et al.* 2012b; Shi *et al.* 2013).

6 Die Mechanosensitivität des $\alpha\beta\gamma$ ENaC vs. $\delta\beta\gamma$ ENaC

In der vorliegenden Arbeit konnte für beide Kanäle ($\alpha\beta\gamma$ und $\delta\beta\gamma$) eine mechanische Aktivierung durch SK nachgewiesen werden. Trotz dieses Umstandes zeigten sich sowohl in der SK-Wahrnehmung, als auch in der Reaktion auf SK deutliche Unterschiede.

Dies betraf sowohl die Reversibilität (vgl. Abschnitt 2.1.2), als auch die Höhe des SK-Effektes. Der SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC war – bei identischer SK-Rate – jeweils deutlich höher als derjenige des $\delta\beta\gamma$ ENaC ($\sim 380\%$ vs. $\sim 100\%$ bei $0,3 \text{ dyn/cm}^2$). Zu dem gleichen Ergebnis kam auch die Arbeitsgruppe um Kleyman (2011). Sie beobachteten am $\alpha\beta\gamma$ ENaC eine durch SK ($0,2 \text{ dyn/cm}^2$) induzierte Aktivierung des humanen $\alpha\beta\gamma$ ENaC um $\sim 45\%$, während die Aktivität des $\delta\beta\gamma$ ENaC unter gleichen Bedingungen lediglich um $\sim 23\%$ gesteigert wurde (Abi-Antoun *et al.* 2011). Die Tatsache, dass der $\delta\beta\gamma$ ENaC eine geringere Reaktion auf SK zeigt, ist insofern nicht verwunderlich, als dass SK den ENaC über eine Erhöhung seiner Offenwahrscheinlichkeit (P_o) aktiviert (Althaus *et al.* 2007; Fronius *et al.* 2010). Da der $\delta\beta\gamma$ ENaC bereits eine im Vergleich zum $\alpha\beta\gamma$ ENaC höhere intrinsische P_o besitzt (Haerteis *et al.* 2009; Giraldez 2012), kann SK bei diesem nur bedingt eine zusätzliche Aktivitätserhöhung verursachen.

Die SK-Effekte zwischen $\alpha\beta\gamma$ - und $\delta\beta\gamma$ ENaC unterscheiden sich zudem in ihrer Zeitkonstante (Abi-Antoun *et al.* 2011). Dies bedeutet, dass der $\delta\beta\gamma$ ENaC wesentlich schneller mit einer Aktivitätserhöhung auf SK reagiert als der $\alpha\beta\gamma$ ENaC (Abi-Antoun *et al.* 2011). Die Zeitkonstante wird jedoch ausschließlich von der Geschwindigkeit bestimmt, mit der ein in der Peripherie des Kanals detektierter Reiz über multiple, miteinander gekoppelte Konformationsänderungen der einzelnen Sub-Domänen auf die Pore übertragen wird (Abi-Antoun *et al.* 2011). Die Geschwindigkeit des SK-Effektes ist daher völlig unabhängig von der P_o des Kanals (Abi-Antoun *et al.* 2011). Aus diesem Grund wird angenommen, dass nicht nur die unterschiedlichen P_o 's der beiden Kanäle für den differenzierten SK-Effekt verantwortlich

sind, sondern auch Unterschiede im *gating* der Kanäle (Abi-Antoun *et al.* 2011). Die Tatsache, dass die SK-Detektion des $\alpha\beta\gamma$ ENaC im Gegensatz zum $\delta\beta\gamma$ ENaC über eine Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix erfolgt, demonstriert nun einen weiteren Unterschied in der SK-vermittelten Aktivierung der beiden Kanäle.

Dies impliziert, dass beide Kanäle mit unterschiedlichen mechanosensitiven Eigenschaften ausgezeichnet sind. Begründet sein könnte dies in der unterschiedlichen Gewebsverteilung der beiden Proteine: Die α -Untereinheit weist eine prominente Expression in Geweben auf, die den Scherkräften der Körperflüssigkeiten unmittelbar ausgesetzt sind. Dazu zählen beispielsweise der distale Tubulus und das Sammelrohr der Niere, das Blutgefäßsystem oder die Lunge (Kellenberger und Schild 2015). Hier könnte die mechanische Regulation des $\alpha\beta\gamma$ ENaC von essentieller physiologischer Bedeutung sein, da sie die Fließgeschwindigkeit der Körperflüssigkeiten mit der Na^+ -Resorptionsrate koppelt (Fronius und Clauss 2008). Auch scheint die mechanische Aktivierung des $\alpha\beta\gamma$ ENaC eine Grundvoraussetzung für dessen Aktivität zu sein, da der Na^+ -Strom bei Verlust der mechanischen Aktivierung (sei es durch das Stoppen der Perfusion oder die fehlende Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix) deutlich reduziert wurde (vgl. Abb. 43). Die Mechanosensitivität des $\alpha\beta\gamma$ ENaC könnte damit beispielsweise in der Niere einem Salz- und Flüssigkeitsverlust vorbeugen. Bei einer Erhöhung des Flüssigkeitsvolumens des Primärharns (und damit erhöhter SK) würde die Aktivität des $\alpha\beta\gamma$ ENaC erhöht und auf diese Weise sowohl vermehrt Na^+ -, als auch Wasser rückresorbiert. Die Fähigkeit des $\alpha\beta\gamma$ ENaC, Scherkraft zu detektieren, kann somit unmittelbar in die Regulation physiologischer Prozesse, u.a. der Aufrechterhaltung der Salz- und Wasser-Homöostase, involviert sein.

Bedenkt man jedoch das Expressionsmuster der δ -Untereinheit, so wird deutlich, dass diese überwiegend in Geweben exprimiert ist, die weder mit Na^+ -Resorption in Verbindung gebracht, noch unmittelbaren Scherkräften ausgesetzt sind (z.B. im Gehirn, Leber oder Pankreas, (Giraldez 2012)). Auch ist die physiologische Bedeutung und Funktion dieser Untereinheit bislang nicht eindeutig geklärt (Giraldez 2012). Obwohl die heterologe Expression der δ -Untereinheit (allein oder in Kombination mit β und γ) zur Ausbildung Na^+ -leitender Kanäle führt, konnte bisher noch in keinem nativen Gewebe ein experimenteller Nachweis für einen durch den $\delta\beta\gamma$ ENaC vermittelten Na^+ -Strom erbracht werden (Giraldez 2012). Daher bleibt sowohl fraglich, ob die δ -Untereinheit in nativen Geweben überhaupt in Kombination mit β und γ einen Na^+ -leitenden Kanal bildet, als auch, ob dessen Mechanosensitivität *in vivo* von physiologischer Bedeutung ist.

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse kann jedoch zusammenfassend davon ausgegangen werden, dass die SK-Detektion des $\alpha\beta\gamma$ - und $\delta\beta\gamma$ ENaC über alternative Mechanismen erfolgt.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der molekulare Mechanismus identifiziert werden, welcher der SK-Detektion des $\alpha\beta\gamma$ ENaC zu Grunde liegt. So konnte in Übereinstimmung mit dem *tethered* Modell gezeigt werden, dass der $\alpha\beta\gamma$ ENaC zur Wahrnehmung von SK (zumindest im heterologen Oozyten-Expressionssystem) eine Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix benötigt. Obwohl die exakten mit dem Kanal verknüpften Komponenten der Extrazellulären Matrix nicht bestimmt werden konnten, wurden jedoch mit den Asparaginen 312 und 511 innerhalb der Extrazellulären Domäne des α ENaC diejenigen Aminosäuren identifiziert, die über ihre Glykosylierung für die Ausbildung der Verknüpfung verantwortlich sind. Auf diese Weise konnte ein neuartiger und bisher nicht bekannter Aktivierungsmechanismus des $\alpha\beta\gamma$ ENaC beschrieben und charakterisiert werden.

Ob die SK-Detektion des humanen $\alpha\beta\gamma$ ENaC jedoch auch *in vivo* über die Verankerung in der Extrazellulären Matrix erfolgt, und ob sie über die Glykosylierung derselben Asparagine erfolgt, bedarf weiterführender Untersuchungen. Erste Hinweise darauf, dass eine Verbindung zur Extrazellulären Matrix für die mechanische Regulation des $\alpha\beta\gamma$ ENaC im Menschen essentiell ist, existieren bereits. So wurden in den vergangenen Jahren mehrere Patente angemeldet, die eine therapeutische Behandlung mit dem Enzym Hyaluronidase zur Prävention und Senkung von arteriellem Bluthochdruck vorsehen (Burgard 2008; Diter und Burgard 2009; Cullmann und Burgard 2010). Bisher ist nicht exakt bekannt, wie genau die Gabe von Hyaluronidase zu einer akuten Senkung des Blutdruckes beiträgt (Burgard 2008; Diter und Burgard 2009; Cullmann und Burgard 2010). Die in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse liefern hierfür jedoch eine mögliche Erklärung, welche im Folgenden kurz erläutert werden soll:

Die genaue Bedeutung des $\alpha\beta\gamma$ ENaC in Blutgefäßen (Endothel) ist bislang nicht eindeutig geklärt (Warnock *et al.* 2014). Jedoch führt eine Reduktion der ENaC-Aktivität im Endothel zu einer Senkung des Blutdruckes, während eine erhöhte Anzahl und/oder Aktivität der Kanäle mit einer Erhöhung des Blutdruckes assoziiert ist (Kusche-Vihrog *et al.* 2014a; Warnock *et al.* 2014; Kellenberger und Schild 2015). Auf Grund dessen mehren sich in den vergangenen Jahren die Hinweise darauf, dass der ENaC im Endothel eine Rolle als Mechanosensor einnimmt, der über eine Beeinflussung der SK-vermittelten Stickstoff-Monoxid (NO)-Freisetzung und der daraus resultierenden Gefäßerweiterung unmittelbar in die Blutdruckregulation involviert sein könnte (Pérez *et al.* 2009; Kusche-Vihrog *et al.* 2010; Kusche-Vihrog *et al.* 2014a). Es wäre daher denkbar, dass die in den oben genannten Patenten vorgeschlagene intravenöse Gabe von Hyaluronidase die hauptsächlich aus Hyaluronsäure bestehende (Gouverneur 2005) Extrazelluläre Matrix der Blutgefäße (endotheliale Glykokalyx)

abbaut. Dies könnte - in Übereinstimmung mit den in dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnissen zur SK-Detektion des $\alpha\beta\gamma$ ENaC über eine Verknüpfung zur Extrazellulären Matrix - die Aktivität des $\alpha\beta\gamma$ ENaC in den Blutgefäßen reduzieren. Die auf diese Weise verringerte ENaC-Aktivität könnte somit ursächlich für die Senkung des Blutdruckes sein.

Dies würde bedeuten, dass die im Rahmen dieser Dissertation aufgeklärte Verbindung des $\alpha\beta\gamma$ ENaC zur Extrazellulären Matrix für physiologische Prozesse - wie die Blutdruckregulation - von essentieller Bedeutung sein könnte.

Experimentell nachweisen könnte man dies beispielsweise über die Degradierung der Extrazellulären Matrix an isolierten Blutgefäßen. Sollte der ENaC in Endothelzellen als Mechanosensor fungieren und SK über eine Verbindung zur Glykokalyx detektieren, dann sollte die Vasodilation von Blutgefäßen, deren Glykokalyx mittels Hyaluronidase verdaut wurde (auf Grund der fehlenden mechanischen Aktivierung des ENaC) im Vergleich zur Kontrolle (intakte Glykokalyx) messbar stärker ausfallen. Dieser Versuchsansatz würde daher einen Einblick darin geben, ob der ENaC auch *in vivo* über eine Verbindung zur Extrazellulären Matrix mechanisch reguliert wird. Zudem wäre dies ein erster Hinweis darauf, dass die Mechanosensitivität des ENaC unmittelbar in die Regulation von essentiellen physiologischen Vorgängen, wie die Blutdruckregulation involviert ist.

V Anhang

1 Literaturverzeichnis

Abi-Antoun T, Shi S, Tolino LA, Kleyman TR, Carattino MD (2011)

Second transmembrane domain modulates epithelial sodium channel gating in response to shear stress.
In: *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 300 (5), S. F1089-1095.

Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. (2002)

Molecular Biology of the Cell. The Extracellular Matrix of Animals.
4th edition. New York: Garland Science.

Althaus M. (2006)

Wirkung von laminarem Scher-Stress auf die Aktivität epithelialer Na⁺-Kanäle.
Diplomarbeit.
Justus-Liebig-Universität, Gießen (Institut für Tierphysiologie).

Althaus M, Bogdan R, Clauss WG, Fronius M (2007)

Mechano-sensitivity of epithelial sodium channels (ENaCs): laminar shear stress increases ion channel open probability.
In: *FASEB Journal* 21 (10), S. 2389–2399.

Althaus M, Clauss WG, Fronius M (2011)

Amiloride-sensitive sodium channels and pulmonary edema.
In: *Pulmonary Medicine*, S. 830320.

Alvarez de la Rosa D, Canessa CM, Fyfe GK, Zhang P (2000)

Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels.
In: *Annual Reviews of Physiology* 62 (1), S. 573–594.

Amin MS, Wang HW, Reza E, Whitman SC, Tuana BS, Leenen FH (2005)

Distribution of epithelial sodium channels and mineralocorticoid receptors in cardiovascular regulatory centers in rat brain.
In: *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289(6), S.R1787.

Anantharam A, Tian Y, Palmer LG (2006)

Open probability of the epithelial sodium channel is regulated by intracellular sodium.
In: *The Journal of Physiology* 574 (2), S. 333–347.

Baconguis I, Bohlen CJ, Goehring A, Julius D, Gouaux E (2014)

X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na⁽⁺⁾-selective channel.
In: *Cell* 156 (4), S. 717–729.

Baines D (2013)

Kinases as Targets for ENaC Regulation.
In: *Current Molecular Pharmacology* 6 (1), S. 50–64.

Barisone GA, Krapf D, Correa-Fiz F, Arranz SE, Cabada MO (2007)

Glycoproteins of the vitelline envelope of Amphibian oocyte: Biological and molecular characterization of ZPC component (gp41) in *Bufo arenarum*.
In: *Molecular Reproduction and development* 74 (5), S. 629–640.

Bhalla V, Hallows KR (2008)

Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications.
In: *Journal of the American Society of Nephrology* 19 (10), S. 1845–1854.

Bianchi, L (2007)

Mechanotransduction: touch and feel at the molecular level as modeled in *Caenorhabditis elegans*.
In: *Molecular Neurobiology* 36 (3), S. 254–271.

Bianchi L, Driscoll M (2002)

Protons at the Gate: DEG/ENaC ion channels help us feel and remember.
In: *Neuron* 34 (3), S. 337–340.

Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T et al. (2014)

SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information.
In: *Nucleic Acids Research* 42, S. W252-258.

Blazer-Yost BL, Liu X, Helman SI (1998)

Hormonal regulation of ENaCs: insulin and aldosterone.
In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 274 (5), S. C1373.

Bounoutas A, Chalfie M (2007)

Touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*.
In: *Pflugers Archive* 454 (5), S. 691-702.

Bouvet P, Wolffe AP (1994)

A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* Oocytes.
In: *Cell* 77, S. 931–941.

Bradford MM (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
In: *Analytical Biochemistry* 72 (1–2), S. 248–254.

Brouard M, Casado M, Djelidi S, Barrandon Y, Farman N (1999)

Epithelial sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits and relation to sodium transport and differentiation.
In: *Journal of Cell Science* 112 (19), S. 3343–3352.

Burgard G (2008)

Use of hyaluronidase for the prevention or treatment of arterial hypertension.
Patentschrift, Angemeldet durch Burgard, G. am 14.10.2008. Anmeldenr.: 08017979.9.
Veröffentlichungsnr.: EP 2 177 227 B1.

Burnette WN (1981)

"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.
In: *Analytical Biochemistry* 112, S. 195–203.

Cai Z, Xin J, Pollock DM, Pollock JS (2000)

Shear stress-mediated NO production in inner medullary collecting duct cells.
In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 279 (2), S. F270.

Canessa CM, Merillat AM, Rossier BC (1994)

Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells.
In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 267 (6), S. C1682.

Canessa CM (2007)

Structural biology: Unexpected opening.
In: *Nature* 449 (7160), S. 293–294.

Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC (1993)

Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration.
In: *Nature* 361 (6411), S. 467–470.

Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC (1994)

Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits.

In: *Nature* 367 (6462), S. 463–467.

Carattino MD, Liu W, Hill WG, Satlin LM, Kleyman TR (2007)

Lack of a role of membrane-protein interactions in flow-dependent activation of ENaC.

In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 293 (1), S. F316-324.

Carattino MD, Sheng S, Kleyman TR (2004)

Epithelial Na⁺ channels are activated by laminar shear stress.

In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (6), S. 4120–4126.

Carattino MD, Sheng S, Kleyman TR (2005)

Mutations in the pore region modify epithelial sodium channel gating by shear stress.

In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (6), S. 4393–4401.

Catterall WA (1984)

The molecular basis of neuronal excitability.

In: *Science Signaling* 223 (4637), S. 653–661.

Chalfie M, Au M (1989)

Genetic control of differentiation of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons.

In: *Science* 243 (4894), S. 1027–1033.

Chang SS, Grunder S, Hanukoglu A, Rösler A, Mathew PM, Hanukoglu I, Schild L et al. (1996)

Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1.

In: *Nature Genetics* 12, S. 248–253.

Chen R, Weng L, Sizto NC, Osorio B, Hsu CJ, Rodgers R, Litman DJ (1984)

Ultrasound-accelerated immunoassay, as exemplified by enzyme immunoassay of choriogonadotropin.

In: *Clinical Chemistry* 30 (9), S. 1446–1451.

Choe H, Sackin H (1997)

Improved preparation of *Xenopus* oocytes for patch-clamp recording.

In: *Pflugers Archive* 433 (5), S. 648-652.

Chopra A, Murray ME, Byfield FJ, Mendez MG, Halleluyan R, Restle DJ et al. (2014)

Augmentation of integrin-mediated mechanotransduction by hyaluronic acid.

In: *Biomaterials* 35 (1), S. 71–82.

Collier DM, Peterson ZJ, Blokhin IO, Benson CJ, Snyder PM (2012)

Identification of Extracellular Domain Residues Required for Epithelial Na⁺ Channel Activation by Acidic pH.

In: *Journal of Biological Chemistry* 287, S. 40907-40914.

Collier DM, Snyder PM (2009)

Extracellular protons regulate human ENaC by modulating Na⁺ self-inhibition.

In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (2), S. 792–798.

Collier DM, Snyder PM (2011)

Identification of epithelial Na⁺ channel (ENaC) intersubunit Cl⁻ inhibitory residues suggests a trimeric alpha gamma beta channel architecture.

In: *Journal of Biological Chemistry* (8), S. 6027–6032.

Collier DM, Tomkovicz VR, Peterson ZJ, Benson J, Snyder PM (2014)

Intersubunit conformational changes mediate epithelial sodium channel gating.

In: *Journal of General Physiology* 144 (4), S. 337–348.

Collier DM (2011)

Regulation of epithelial sodium channel (ENaC) activity by extracellular stimuli.
PhD (Doctor of Philosophy) thesis.
University of Iowa, Iowa.
Online verfügbar unter <http://ir.uiowa.edu/etd/4958/>.

Connolly ML (1983)

Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids.
In: *Science* 221, S. 709–713.

Costa AC, Patrick JW, Dani JA (1994)

Improved technique for studying ion channels expressed in *Xenopus* oocytes, including fast superfusion.
In: *Biophysical Journal* 67 (1), S. 395–401.

Cucu D, Simaels J, Eggermont J, van Driessche W, Zeiske W (2005)

Opposite effects of Ni²⁺ on *Xenopus* and rat ENaCs expressed in *Xenopus* oocytes.
In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 289 (4), S. C946.

Cullmann D, Burgard G (2010)

Use of Hyaluronidase for the Prevention or Treatment of Arterial Hypertension or Cardiac Insufficiency.
Google Patents. Online verfügbar unter <http://www.google.com/patents/US20100092450>.

Curtis HJ, Cole Kenneth S (1940)

Membrane action potentials from the squid giant axon.
In: *Journal of Comparative and Cellular Physiology* 15 (2), S. 147–157.

Dascal N (1987)

The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels.
In: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 22 (4), S. 317–387.

David WG, Haiyan C, Randal D (2011)

Role of Hyaluronan In whole lung permeability and mechanotransduction.
In: A61. Lung endothelium functions. The barrier and beyond: *American Thoracic Society* (American Thoracic Society International Conference Abstracts), S. A6364-A6364.

Davis EC (1993)

Stability of elastin in the developing mouse aorta: a quantitative radioautographic study.
In: *Histochemistry* 100 (1), S. 17-26.

Desmedt L, Simaels J, van Driessche W (1991)

Amiloride blockage of Na⁺ channels in amphibian epithelia does not require external Ca²⁺.
In: *Pflugers Archive* 419 (6), S. 632-638.

Diakov A, Korbmacher C (2004)

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 α -subunit.
In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (37), S. 38134–38142.

Diter K, Burgard G (2009)

Using Hyaluronidase for Preventing or Treating Arterial Hypertension or Cardiac Failure.
Patentschrift, Angemeldet durch Burgard, G. am 14.10.2009. Anmeldenr: RU_2009139186_A.
Veröffentlichungsnr: RU_2508124_C2.

Drummond HA, Abboud FM, Welsh MJ (2000)

Localization of β and γ subunits of ENaC in sensory nerve endings in the rat foot pad.
In: *Brain Research* 884 (1–2), S. 1–12.

Drummond HA, Price MP, Welsh MJ (1998)

A molecular component of the arterial baroreceptor mechanotransducer.

In: *Neuron* 21 (6), S. 1435–1441.

Drummond HA, Gebremedhin D, Harder DR (2004)

Degenerin/Epithelial Na⁺ channel proteins: components of a vascular mechanosensor.

In: *Hypertension* 44 (5), S. 643–648.

Drummond HA, Jernigan NL, Grifoni SC (2008)

Sensing tension: epithelial sodium channel/acid-sensing ion channel proteins in cardiovascular homeostasis.

In: *Hypertension* 51 (5), S. 1265–1271.

Drummond HA, Welsh MJ, Abboud FM (2001)

ENaC subunits are molecular components of the arterial baroreceptor complex.

In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 940 (1), S. 42–47.

Duc C, Farman N, Canessa CM, Bonvalet JP, Rossier BC (1994)

Cell-specific expression of epithelial sodium channel alpha, beta, and gamma subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry.

In: *The Journal of Cell Biology* 127 (6), S. 1907–1921.

Duellman WE, Trueb L (1994)

Biology of Amphibians.

Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

Dumont JN (1972)

Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals.

In: *Journal of Morphology* 136 (2), S. 153–179.

Eastwood AL, Goodman MB (2012)

Insight into DEG/ENaC channel gating from genetics and structure.

In: *Physiology* 27 (5), S. 282–290.

Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, Boucher R & Rossier BC (1996)

Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha ENaC-deficient mice.

In: *Nature Genetics* 12 (3), S. 325–328.

Eskandari S, Snyder PM, Kreman M, Zampighi GA, Welsh MJ, Wright EM (1999)

Number of subunits comprising the epithelial sodium channel.

In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (38), S. 27281–27286.

Farman N, Talbot CR, Boucher R, Fay M, Canessa CM, Rossier BC, Bonvalet JP (1997)

Noncoordinated expression of alpha-, beta-, and gamma-subunit mRNAs of epithelial Na⁺ channel along rat respiratory tract.

In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 272 (1), S. C131.

Firsov D, Gautschi I, Merillat AM, Rossier BC, Schild L (1998)

The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC).

In: *The EMBO Journal* 17 (2), S. 344–352.

Franke RP, Grafe M, Schnittler H, Seiffge D, Mittermayer C, Drenckhahn D (1984)

Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress.

In: *Nature* 307 (5952), S. 648–649.

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010)

The extracellular matrix at a glance.

In: *Journal of Cell Science* 123 (Pt 24), S. 4195–4200.

Fricke B, Lints R, Stewart G, Drummond H, Dodt G, Driscoll M, Düring M (2000)

Epithelial Na⁺ channels and stomatin are expressed in rat trigeminal mechanosensory neurons.
In: *Cell and Tissue Research* 299 (3), S. 327–334.

Fronius M (2013)

Treatment of pulmonary edema by ENaC activators/stimulators.
In: *Current Molecular Pharmacology* 6 (1), S. 13–27.

Fronius M, Bogdan R, Althaus M, Morty RE, Clauss WG (2010)

Epithelial Na⁺ channels derived from human lung are activated by shear force.
In: *Respiratory Physiology & Neurobiology* 170 (1), S. 113–119.

Fronius M, Clauss WG (2008)

Mechano-sensitivity of ENaC: may the (shear) force be with you.
In: *Pflugers Archive* 455 (5), S. 775–785

Fu BM, Tarbell JM (2013)

Mechano-sensing and transduction by endothelial surface glycocalyx: composition, structure, and function.
In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 5 (3), S. 381–390.

Gao Y, Miyazaki J, Hart GW (2003)

The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 β -cells.
In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 415 (2), S. 155–163.

Gao Y, Liu S, Huang J, Guo W, Chen J, Zhang Li et al. (2014)

The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes.
In: *BioMed Research International* 2014 (2014), Article ID 648459, 8 pages.

Garty H, Palmer LG (1997)

Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation.
In: *Physiological Reviews* 77 (2), S. 359–396.

Giraldez T, Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Garcia-Marin V, Pagel P, González-Hernández T, Alvarez de la Rosa D (2007)

Cloning and functional expression of a new epithelial sodium channel δ subunit isoform differentially expressed in neurons of the human and monkey telencephalon.
In: *Journal of Neurochemistry* 102 (4), S. 1304–1315.

Giraldez T, Rojas P, Jou J, Flores C, Alvarez de la Rosa D (2012)

The epithelial sodium channel δ -subunit: new notes for an old song.
In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 303 (3), S. F328.

Golestaneh N, Klein C, Valamanesh F, Suarez G, Agarwal MK, Mirshahi M (2001)

Mineralocorticoid receptor-mediated signaling regulates the ion gated sodium channel in vascular endothelial cells and requires an intact cytoskeleton.
In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280 (5), S. 1300–1306.

Gouverneur MS, Jos AE, Pannekoek H, Fontijn RD, Vink H (2005)

Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx.
In: *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 290 (1), S. H458.

Grabias BM, Konstantopoulos K (2013)

Notch4-dependent antagonism of canonical TGF- β 1 signaling defines unique temporal fluctuations of SMAD3 activity in sheared proximal tubular epithelial cells.
In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 305 (1), S. F123.

Grey RD, Wolf DP, Hedrick JL (1974)

Formation and structure of the fertilization envelope in *Xenopus laevis*.
In: *Developmental Biology* 36 (1), S. 44–61.

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971)

Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger rna and its translation in living cells.
In: *Nature* 233 (5316), S. 177–182.

Haerteis S, Krueger B, Korbmacher C, Rauh R (2009)

The δ -subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) enhances channel activity and alters proteolytic ENaC activation.
In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (42), S. 29024–29040.

Halper J, Kjaer M (2014)

Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins.
In: Jaroslava Halper (Hg.): *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases*, Bd. 802: Springer Netherlands (Advances in Experimental Medicine and Biology), S. 31-47.

Hamill OP, Martinac B (2001)

Molecular Basis of Mechanotransduction in Living Cells.
In: *Physiological Reviews* 81 (2), S. 685–740.

Harris M, Garcia-Caballero A, Stutts M, Firsov D, Rossier BC (2008)

Preferential assembly of epithelial sodium channel (ENaC) subunits in *Xenopus* Oocytes: role of furin-mediated endogenous proteolysis.
In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (12), S. 7455–7463.

Haubrich R (1961)

Hierarchical behaviour in the South African clawed frog *Xenopus laevis* Daudin.
In: *Animal Behaviour* (1–2), S. 71–76.

Hedrick JL, Nishihara T (1991)

Structure and function of the extracellular matrix of anuran eggs.
In: *Journal of Electron Microscopy Technique* 17 (3), S. 319–335.

Hilken G, Iglauer F, Richter HP (1997)

Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Labortier.
1 ed. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B (1952)

Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*.
In: *The Journal of Physiology* 116 (4), S. 424–448.

Hoger JH, Ilyin VI, Forsyth S, Hoger A (2002)

Shear stress regulates the endothelial Kir2.1 ion channel.
In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (11), S. 7780–7785.

Hokputsa S, Jumel K, Alexander C, Harding SE (2003)

A comparison of molecular mass determination of hyaluronic acid using SEC/MALLS and sedimentation equilibrium.
In: *European Biophysics Journal* 32 (5), S. 450-456.

Hubbard C, McNamara JT, Azumaya C, Patel MS, Zimmer J (2012)

The Hyaluronan Synthase Catalyzes the Synthesis and Membrane Translocation of Hyaluronan.
In: *Journal of Molecular Biology* 418 (1–2), S. 21–31.

Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E (2007)

Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH.
In: *Nature* 449 (7160), S. 316–323.

Johnsen VK, Ussing HH, Zerahn K (1953)

The origin of the short-circuit current in the adrenaline stimulated frog skin.
In: *Acta Physiologica Scandinavica* 27 (1), S. 38–48

Karpushev AV, Ilatovskaya DV, Staruschenko A (2010)

The actin cytoskeleton and small G protein RhoA are not involved in flow-dependent activation of ENaC.
In: *BMC Research Notes* 3, S. 210

Kashlan OB, Adelman JL, Okumura S, Blobner BM, Zuzek Z, Hughey RP et al. (2011)

Constraint-based, homology model of the extracellular domain of the epithelial Na⁺ channel α subunit reveals a mechanism of channel activation by proteases.
In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (1), S. 649–660.

Kashlan OB, Kleyman TR (2011)

ENaC structure and function in the wake of a resolved structure of a family member.
In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 301 (4), S. F684.

Kellenberger S, Schild L (2002)

Epithelial sodium channel/Degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure.
In: *Physiological Reviews* 82 (3), S. 735–767.

Kellenberger S, Schild L (2015)

International Union of basic and clinical pharmacology. XCI. Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na⁺ channel.
In: *Pharmacological Reviews* 67 (1), S. 1–35.

Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T (2009)

The SWISS-MODEL Repository and associated resources.
In: *Nucleic Acids Research*. 37, S. D387-392.

Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA (2002)

Elastic fibres.
In: *Journal of Cell Science* 115 (14), S. 2817–2828.

Kim SH, Turnbull J, Guimond S (2011)

Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor.
In: *Journal of Endocrinology* 209 (2), S. 139–151.

Kizer N, Guo XL, Hruska K (1997)

Reconstitution of stretch-activated cation channels by expression of the α -subunit of the epithelial sodium channel cloned from osteoblasts.
In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (3), S. 1013–1018.

Kleyman TR, Carattino MD, Hughey RP (2009)

ENaC at the Cutting Edge: Regulation of Epithelial Sodium Channels by Proteases.
In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (31), S. 20447–20451.

Konstas AA, Korbmacher C (2003)

The γ -subunit of ENaC is more important for channel surface expression than the β -subunit.
In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 284 (2), S. C447.

Krattenmacher R, Claus WG (1988)

Electrophysiological analysis of sodium-transport in the colon of the frog (*Rana esculenta*).
In: *Pflugers Archive* 411 (6), S. 606-612.

Krishtal O (2003)

The ASICs: Signaling molecules? Modulators?
In: *Trends in Neurosciences* 26 (9), S. 477–483.

Kusche-Vihrog K, Callies C, Fels J, Oberleithner H (2010)

The epithelial sodium channel (ENaC): Mediator of the aldosterone response in the vascular endothelium?
In: *The Sixth International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones* 75 (8–9), S. 544–549.

Kusche-Vihrog K, Jeggle P, Oberleithner H (2014a)

The role of ENaC in vascular endothelium.
In: *Pflugers Archive* 466 (5), S. 851–859.

Kusche-Vihrog K, Tarjus A, Fels J, Jaisser F (2014b)

The epithelial Na⁺ channel: a new player in the vasculature.
In: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 23 (2); S. 143–148.

La Trujillo E, Alvarez de la Rosa D, Mobasheri A, González T, Canessa CM, Martín-Vasallo P (1999)

Sodium transport systems in human chondrocytes. II. Expression of ENaC, Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter and Na⁺/H⁺ exchangers in healthy and arthritic chondrocytes.
In: *Histology and Histopathology* 14 (4), S. 1023–1031.

Larabell CA (1988)

The extracellular matrix of *Xenopus laevis* eggs: a quick-freeze, deep-etch analysis of its modification at fertilization.
In: *The Journal of Cell Biology* 107 (2), S. 731–741.

Larabell CA, Chandler DE (1989)

The coelomic envelope of *Xenopus laevis* eggs: a quick-freeze, deep-etch analysis.
In: *Developmental Biology* 131 (1), S. 126–135.

Laurent TC, Fraser JR (1992)

Hyaluronan.
In: *The FASEB Journal* 6 (7), S. 2397–2404.

Li T, Folkesson HG (2006)

RNA interference for α -ENaC inhibits rat lung fluid absorption *in vivo*.
In: *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 290 (4), S. L649.

Liddle GW, Bledsoe T, Coppage WS Jr (1963)

A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion.
In: *Transaction of the American Association of Physicians* 76, S. 199–213.

Lin W, Finger TE, Rossier BC, Kinnamon SC (1999)

Epithelial Na⁺ channel subunits in rat taste cells: Localization and regulation by aldosterone.
In: *Journal of Comparative Neurology* 405 (3), S. 406–420.

Lingueglia E, Champigny G, Lazdunski M, Barbry P (1995)

Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel.
In: *Nature* 378 (6558), S. 730–733.

Lokeshwar VB, Schroeder GL, Carey RI, Soloway MS, Iida N (2002)

Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing.
In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (37), S. 33654–33663.

Mackay D, Meares P (1959)

On the correction for unstirred solution films in ion-exchange membrane cells.
In: *Colloid & Polymer Science* 167 (1), S. 31–39.

Mairbäurl H (2006)

Role of alveolar epithelial sodium transport in high altitude pulmonary edema (HAPE).
In: *New Directions in Exercise Physiology* 151 (2–3), S. 178–191.

Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O'Neal WK, Boucher RC (2004)

Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice.
In: *Nature Medicine* 10 (5), S. 487–493.

Marcellin E, Steen JA, Nielsen LK (2014)

Insight into hyaluronic acid molecular weight control.
In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (16), S. 6947–6956.

Martinac B (2004)

Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction.
In: *Journal of Cell Science* 117 (12), S. 2449–2460.

Matalon S, O'Brodovich H (1999)

Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance.
In: *Annual Reviews of Physiology* 61 (1), S. 627–661.

Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C (2002)

Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema.
In: *Physiological Reviews* 82 (3), S. 569–600.

Mauro T, Guitard M, Behne M, Oda Y, Crumrine D, Komuves L et al. (2002)

The ENaC channel is required for normal epidermal differentiation
In: *Journal of Investigative Dermatology* 118 (4), S. 589–594.

Mazzochi C, Benos DJ, Smith PR (2006)

Interaction of epithelial ion channels with the actin-based cytoskeleton.
In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 291 (6), S. F1113–F1122

Mazzochi C, Bubien JK, Smith PR, Benos DJ (2006)

The carboxyl terminus of the α -subunit of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel binds to f-actin.
In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (10), S. 6528–6538.

Mcnaughton KJ, Sinclair CG (1966)

Submerged jets in short cylindrical flow vessels.
In: *Journal of Fluid Mechanics* 25 (2), S. 367–375.

Mecham RP, Broekelmann TJ, Fliszar CJ, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM (1997)

Elastin Degradation by Matrix Metalloproteinases: cleavage site specificity and mechanisms of elastolysis.
In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (29), S. 18071–18076.

Menzel EJ, Farr C (1998)

Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses.
In: *Cancer Letters* 131 (1), S. 3–11.

Mertz JE, Gurdon JB (1977)

Purified DNAs are transcribed after microinjection into *Xenopus* oocytes.
In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (4), S. 1502–1506.

Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Spaan JAE, Kajiya F (2003)

Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release.
In: *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 285 (2), S. H722.

Morimoto T, Liu W, Woda C, Carattino MD, Wei Y, Hughey RP et al. (2006)

Mechanism underlying flow stimulation of sodium absorption in the mammalian collecting duct.
In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 291 (3), S. F663-F669.

Moyes CD, Schulte PM (2008)

Tierphysiologie.
München: Pearson Studium.

Nauli SM, Rossetti S, Kolb RJ, Alenghat FJ, Consugar MB, Harris PC et al. (2006)

Loss of Polycystin-1 in human cyst-lining epithelia leads to ciliary dysfunction.
In: *Journal of the American Society of Nephrology* 17 (4), S. 1015–1025.

African clawed frog

NCBI Taxonomy Database: Taxonomy ID 8355.

Online verfügbar unter:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=8355&lvl=3&keep=1&src_hmode=1&unlock&lin=s.

Neher E, Sakmann B (1976)

Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.
In: *Nature* 260 (5554), S. 799–802.

Ng L, Grodzinsky AJ, Patwari P, Sandy Jo, Plaas A, Ortiz C (2003)

Individual cartilage aggrecan macromolecules and their constituent glycosaminoglycans visualized *via* atomic force microscopy.
In: *Journal of Structural Biology* 143 (3), S. 242–257.

Nič M, Jirát J, Košata B, Jenkins A, McNaught A (Hg.) (2009)

IUPAC Compendium of Chemical Terminology.
Research Triangle Park, NC: IUPAC.

Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JBL, Kastelein JJP, Stroes ESG (2005)

The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease.
In: *Current Opinion in Lipidology* 16 (5), S. 507-11

O'Hagan R, Chalfie M, Goodman MB, (2004)

The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals.
In: *Nature Neuroscience* 8 (1), S. 43–50.

Olesen SP, Clapham D, Davies P (1988)

Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells.
In: *Nature* 331 (6152), S. 168–170.

Olver RE, Ramsden CA, Strang LB, Walters DV (1986)

The role of amiloride-blockable sodium transport in adrenaline-induced lung liquid reabsorption in the fetal lamb.
In: *The Journal of Physiology* 376 (1), S. 321–340.

Palmer LG (1982)

Na⁺ transport and flux ratio through apical Na⁺ channels in toad bladder.
In: *Nature* 297 (5868), S. 688–690.

Palmer LG (1992)

Epithelial Na Channels: Function and Diversity.
In: *Annual Reviews of Physiology* 54 (1), S. 51–66.

Palmer LG, Frindt G (1986)

Amiloride-sensitive Na channels from the apical membrane of the rat cortical collecting tubule.
In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83 (8), S. 2767–2770.

Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S (2014)

Physiologie
Thieme. Online verfügbar unter <http://books.google.de/books?id=l6bTBAAAQBAJ>.

Penzlin H (2005)

Lehrbuch der Tierphysiologie.
7. Aufl.
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Pérez FR, Venegas F, González M, Andrés S, Vallejos C, Riquelme G et al. (2009)

Endothelial epithelial sodium channel inhibition activates endothelial nitric oxide synthase *via* phosphoinositide 3-kinase/akt in small-diameter mesenteric arteries.
In: *Hypertension* 53 (6), S. 1000–1007.

Perry SJ, Straub VA, Schofield MG, Burke JF, Benjamin PR (2001)

Neuronal Expression of an FMRamide-Gated Na⁺ Channel and Its Modulation by Acid pH.
In: *The Journal of Neuroscience* 21 (15), S. 5559–5567.

Pouzin O

African Clawed Frog. (Hg. v. a-z animals).
Online verfügbar unter <http://a-z-animals.com/animals/african-clawed-frog/>.

Reddy MM, Light MJ, Quinton PM (1999)

Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl⁻ channel function.
In: *Nature* 402 (6759), S. 301–304.

Renard S, Voilley N, Bassilana F, Lazdunski M, Barbry P (1995)

Localization and regulation by steroids of the alpha, beta and gamma subunits of the amiloride-sensitive Na⁺ channel in colon, lung and kidney.
In: *Pflugers Archive* 430 (3), S. 299–307.

Renart J, Reiser J, Stark GR (1979)

Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.
In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76 (6), S. 3116–3120.

Rossier BC (1998)

Mechanosensitivity of the epithelial sodium channel (ENaC): controversy or pseudocontroversy?
In: *Journal of General Physiology* 112 (2), S. 95–96.

Rossier BC (2002)

Hormonal Regulation of the Epithelial Sodium Channel ENaC: N or Po?
In: *The Journal of General Physiology* 120 (1), S. 67–70.

Rossier BC (2004)

The Epithelial Sodium Channel: Activation by Membrane-Bound Serine Proteases.
In: *Proceedings of the American Thoracic Society* 1 (1), S. 4–9.

Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E (2002)

Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors.
In: *Annual Reviews of Physiology* 64 (1), S. 877–897.

- Saldías F, Lecuona E, Friedman E, Barnard ML, Ridge KM, Sznajder JI (1998)**
Modulation of lung liquid clearance by isoproterenol in rat lungs.
In: *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 274 (5), S. L694.
- Satlin LM, Sheng S, Woda CB, Kleyman TR (2001)**
Epithelial Na⁺ channels are regulated by flow.
In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 280 (6), S. 1010-1018.
- Seror J, Merkher Y, Kampf N, Collinson L, Day AJ, Maroudas A, Klein J (2012)**
Normal and shear interactions between hyaluronan–aggrecan complexes mimicking possible boundary lubricants in articular cartilage in synovial joints.
In: *Biomacromolecules* 13 (11), S. 3823–3832.
- Sheng S (2003)**
Extracellular histidine residues crucial for Na⁺ self-inhibition of epithelial Na⁺ channels.
In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (11), S. 9743–9749.
- Sheng S (2004)**
Extracellular Zn²⁺ activates epithelial Na⁺ Channels by eliminating Na⁺ self-inhibition.
In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (30), S. 31687–31696.
- Sheng S, Carattino MD, Bruns JB, Hughey RP, Kleyman TR (2006)**
Furin cleavage activates the epithelial Na⁺ channel by relieving Na⁺ self-inhibition.
In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 290 (6), S. F1488-F1496.
- Shi S, Blobner BM, Kashlan OB, Kleyman TR (2012a)**
Extracellular finger domain modulates the response of the epithelial sodium channel to shear stress.
In: *Journal of Biological Chemistry* 287, S. 15439-15444.
- Shi S, Carattino MD, Hughey RP, Kleyman TR (2013)**
ENaC Regulation by Proteases and Shear Stress.
In: *Current Molecular Pharmacology* 999, S. 7–12.
- Shi S, Carattino MD, Kleyman TR (2012b)**
Role of the Wrist Domain in the Response of the Epithelial Sodium Channel to External Stimuli.
In: *Journal of Biological Chemistry*. 287, S. 44027-44035.
- Shi S, Ghosh DD, Okumura S, Carattino MD, Kashlan OB, Sheng S, Kleyman TR (2011)**
Base of the thumb domain modulates epithelial sodium channel gating.
In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (17), S. 14753–14761.
- Shimkets RA, Lifton R, Canessa CM (1998)**
In vivo phosphorylation of the epithelial sodium channel.
In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (6), S. 3301–3305.
- Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambela M *et al.* (1994)**
Liddle's syndrome: Heritable human hypertension caused by mutations in the β subunit of the epithelial sodium channel.
In: *Cell* 79 (3), S. 407–414.
- Shirasu Y, Yoshida H, Matsuki S, Takemura K, Ikeda N, Shimada Y *et al.* (1987)**
Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding human pancreatic elastase 2.
In: *Journal of Biochemistry* 102 (6), S. 1555–1563.
- Snyder PM, McDonald FJ, Stokes JB, Welsh MJ (1994)**
Membrane topology of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel.
In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (39), S. 24379–24383.

Snyder PM, Cheng C, Prince LS, Rogers JC, Welsh MJ (1998)

Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits.

In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (2), S. 681–684.

Snyder PM, Olson DR, Bucher DB (1999)

A Pore Segment in DEG/ENaC Na⁺ Channels.

In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (40), S. 28484–28490.

Snyder PM, Price MP, McDonald FJ, Adams CM, Volk KA, Zeiher BG et al. (1995)

Mechanism by which *Liddle's syndrome* mutations increase activity of a human epithelial Na⁺ channel.

In: *Cell* 83 (6), S. 969–978.

Sobczak K, Bangel-Ruland N, Leier G, Weber WM (2010)

Endogenous transport systems in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane.

In: *Xenopus Oocytes as an Experimental System* 51 (1), S. 183–189.

Soreq H (1985)

The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-injected *Xenopus oocytes*.

In: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 18 (3), S. 199–236.

Spirin AS (1994)

Storage of messenger RNA in eukaryotes: Envelopment with protein, translational barrier at 5' side, or conformational masking by 3' side?

In: *Molecular Reproduction and development*. 38 (1), S. 107–117.

Spofford CM, Chilian WM (2001)

The elastin-laminin receptor functions as a mechanotransducer in vascular smooth muscle.

In: *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 280 (3), S. H1354.

Spofford CM, Chilian WM (2003)

Mechanotransduction via the elastin–laminin receptor (ELR) in resistance arteries.

In: *Journal of Biomechanics* 36 (5), S. 645–652.

Steen P Van den, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G (1998)

Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation.

In: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 33 (3), S. 151–208.

Sumikawa K, Houghton M, Emtage JS, Richards BM, Barnard EA (1981)

Active multi-subunit ACh receptor assembled by translation of heterologous mRNA in *Xenopus oocytes*.

In: *Nature* 292 (5826), S. 862–864.

Supplisson S, Bergman C (1997)

Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus Oocytes*.

In: *The Journal of Neuroscience* 17 (12), S. 4580–4590.

Tarbell JM, Ebong EE (2008)

The endothelial glycocalyx: a mechano-sensor and -transducer.

In: *Science Signaling* 1 (40), S. pt8.

Tarran R, Button B, Boucher RC (2006)

Regulation of normal and cystic fibrosis airway surface liquid volume by phasic shear stress.

In: *Annual Reviews of Physiology* 68 (1), S. 543–561.

Tarran R, Button B, Picher M, Paradiso AM, Ribeiro CM, Lazarowski ER et al. (2005)

Normal and Cystic Fibrosis Airway Surface Liquid Homeostasis: The Effects of Phasic Shear Stress and Viral Infections.

In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (42), S. 35751–35759.

Tavernarakis N, Driscoll M (1997)

Molecular modeling of mechanotransduction in the Nematode *Caenorhabditis elegans*.
In: *Annual Reviews of Physiology* 59 (1), S. 659–689.

Taylor M, Johnson AD, Smith LDA (1985)

Growing *Xenopus* oocytes have spare translational capacity.
In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (19), S. 6586–6589.

Tolino LA, Okumura S, Kashlan OB, Carattino MD (2011)

Insights into the mechanism of pore opening of acid-sensing ion channel 1a.
In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (18), S. 16297–16307.

Turnheim K (1991)

Intrinsic regulation of apical sodium entry in epithelia.
In: *Physiological Reviews* 71 (2), S. 429–445.

Vagin O, Kraut JA, Sachs G (2009)

Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia.
In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 296 (3), S. F459.

Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC (1997)

An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel.
In: *Nature* 389 (6651), S. 607–610.

Nernst W (1904)

Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen.
In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 47, S. 52–55.

Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Bröer S (2000)

The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins.
In: *Cellular Physiology and Biochemistry* (1-2), S. 1–12.

Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Voilley N, Lazdunski M (1995)

Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na⁺ channel.
In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (46), S. 27411–27414.

Wang SU, Meng FEI, Mohan S Champaneri B, Gu Y (2009)

Functional ENaC channels expressed in endothelial cells: a new candidate for mediating shear force.
In: *Microcirculation* 16 (3), S. 276–287.

Warnock DG (2013)

The amiloride-sensitive endothelial sodium channel and vascular tone.
In: *Hypertension* 61 (5), S. 952–954.

Warnock DG, Kusche-Vihrog K, Tarjus A, Sheng S, Oberleithner H, Kleyman TR, Jaisser F (2014)

Blood pressure and amiloride-sensitive sodium channels in vascular and renal cells.
In: *Nature reviews. Nephrology* 10 (3), S. 146–157.

Weber WM, Dannenmaier B, Clauss WG (1993)

Ion transport across leech integument.
In: *Journal of comparative Physiology* 163 (2), S. 153-159.

Weinbaum S, Zhang X, Han Y, Vink H, Cowin SC (2003)

Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx.
In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (13), S. 7988–7995.

Wesch D, Althaus M, Miranda P, Cruz-Muros I, Fronius M, Gonzalez-Hernandez T et al. (2012)

Differential N termini in epithelial Na⁺ channel-subunit isoforms modulate channel trafficking to the membrane.

In: *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 302 (6), S. C868.

Wolf DP, Nishihara T, West DM, Wyrick, RE, Hedrick JL (1976)

Isolation, physicochemical properties, and the macromolecular composition of the vitelline and fertilization envelopes from *Xenopus laevis* eggs.

In: *Biochemistry* 15 (17), S. 3671–3678.

Zampighi GA, Kreman M, Boorer KJ, Loo DDF, Bezanilla F, Chandy G et al. (1995)

A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes.

In: *Journal of Membrane Biology* 148 (1), S. 65-78.

Zanini D, Göpfert MC (2013)

Mechanosensation: tethered ion channels.

In: *Current biology* 23 (9), S. R349-351.

Zeiske W, Onken H, Schwarz HJ, Graszynski K (1992)

Invertebrate epithelial Na⁺ channels: amiloride-induced current-noise in crab gill.

In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1105 (2), S. 245–252.

Zhang Y, Skolnick J (2005)

The protein structure prediction problem could be solved using the current PDB library.

In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (4), S. 1029–1034.

2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des epithelialen Na ⁺ -Kanals	4
Abb. 2:	Funktion des ENaC im distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere	8
Abb. 3:	Hypothetische Rolle der Extrazellulären Domänen als Scherkraft-Sensoren	13
Abb. 4:	Potenzielle Rolle der Extrazellulären Matrix in der Scherkraft-Wahrnehmung des ENaC	14
Abb. 5:	<i>Xenopus laevis</i> und seine Oozyten	18
Abb. 6:	Die Extrazelluläre Matrix von <i>Xenopus</i> Oozyten	22
Abb. 7:	Mechanische Devitellinisierung einer <i>Xenopus</i> Oozyte	23
Abb. 8:	Versuchsablauf zur Bestimmung des Einflusses der Vitellinhülle auf den SK-Effekt	24
Abb. 9:	Versuchsablauf zur Bestimmung des SK-Effektes nach enzymatischem Abbau der Extrazellulären Matrix	26
Abb. 10:	Plasmidkarte des pTNT Vektors (Promega)	27
Abb. 11:	cRNA der humanen ENaC-Untereinheiten	34
Abb. 12:	Schematische Darstellung der Mutagenese-PCR	37
Abb. 13:	Temperatur-Zeit-Schema der Mutagenese-PCR	39
Abb. 14:	Fraktionierung des Oozyten-Extraktes	41
Abb. 15:	Pipettierschema für den Bradford-Assay	43
Abb. 16:	Deglykosylierung eines N-glykosylierten Asparaginrestes durch PNGase F	44
Abb. 17:	Schematischer Aufbau der verwendeten Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	53
Abb. 18:	Aufbau der Messkammer zur Applikation von Scherkraft auf Oozyten	55
Abb. 19:	Das Messprinzip der <i>Patch Clamp</i> Technik	60
Abb. 20:	<i>Patch</i> -Konfigurationen	61
Abb. 21:	Der Einfluss von Scherkraft (SK) auf den humanen $\alpha\beta\gamma$ ENaC	70
Abb. 22:	Die Variabilität des SK-Effektes	71
Abb. 23:	Kontroll-Messungen zum Effekt von Scherkraft	71
Abb. 24:	Dosis-Wirkungskurve für extrazelluläres Na ⁺ am $\alpha\beta\gamma$ ENaC	73
Abb. 25:	Der Einfluss von Scherkraft auf beide Isoformen des $\delta\beta\gamma$ ENaC	74
Abb. 26:	Beide Isoformen des $\delta\beta\gamma$ ENaC wurden in gleichem Ausmaß durch Scherkraft aktiviert	75
Abb. 27:	Kontrollen zum Effekt von Scherkraft auf den $\delta\beta\gamma$ ENaC	75
Abb. 28:	Dosis-Wirkungskurve für extrazelluläres Na ⁺ am $\delta 1\beta\gamma$ ENaC	76
Abb. 29:	Der SK-Effekt des $\delta\beta\gamma$ ENaC bei erhöhter Na ⁺ -Konzentration, bzw. Osmolarität	77
Abb. 30:	Der $\alpha\beta\gamma$ ENaC wurde reversibel und repetitiv durch Scherkräfte aktiviert	79
Abb. 31:	Der $\delta 1\beta\gamma$ ENaC wird repetitiv, jedoch nicht vollständig reversibel durch Scherkräfte aktiviert	80
Abb. 32:	Die Repetitivität und Reversibilität des $\delta 2\beta\gamma$ ENaC	81
Abb. 33:	Die Dosis-Abhängigkeit des SK-Effektes bei $\alpha\beta\gamma$ ENaC exprimierenden Oozyten.	82
Abb. 34:	Die Dosisabhängige Aktivierung des $\alpha\beta\gamma$ ENaC durch Scherkraft	82
Abb. 35:	Die Dosisabhängige Aktivierung des $\delta\beta\gamma$ ENaC durch Scherkraft	83
Abb. 36:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche von Oozyten	85
Abb. 37:	Die Vitellinhülle hat keinen Einfluss auf die Höhe des SK-Effektes	86
Abb. 38:	Die Degradierung von Elastin beeinflusste den SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC nicht	87
Abb. 39:	Inkubation in Hyaluronidase beeinflusste den SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma$ ENaC nicht	88
Abb. 40:	Der Abbau von Komponenten der Extrazellulären Matrix durch Hyaluronidase reduzierte den SK-Effekt devitellinisierter Oozyten	89

Abb. 41: Die Degradierung der Extrazellulären Matrix reduzierte den SK-Effekt des $\delta\beta\gamma\text{ENaC}$ nicht _____	90
Abb. 42: Hypothetisches Modell zur Wahrnehmung und Übertragung von Scherkraft _____	91
Abb. 43: Hyaluronidase reduzierte den SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ _____	93
Abb. 44: Der Einfluss von Hyaluronidase auf Wasser-injizierte Kontroll-Oozyten _____	94
Abb. 45: Der Einfluss von Hyaluronidase auf den $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ in Abwesenheit von Scherkraft _____	95
Abb. 46: Hyaluronidase beeinflusste den SK-Effekt des $\delta\beta\gamma\text{ENaC}$ nicht _____	97
Abb. 47: Schematische Darstellung der N-Glykosylierung eines Asparagins _____	98
Abb. 48: <i>Sequence-Alignment</i> zwischen dem humanem αENaC und dem αENaC der Ratte _____	99
Abb. 49: Hypothetisches Modell zur SK-Übertragung auf den $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ bei Mutation einer potentiellen Verbindungsstelle zur Extrazellulären Matrix _____	100
Abb. 50: Die Zielgerichtete Mutagenese der Asparagine 312 oder 511 der αENaC -Untereinheit reduzierte den SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ _____	101
Abb. 51: Hypothetisches Modell zum Effekt von Hyaluronidase auf Asparagin-Mutanten _____	102
Abb. 52: Vergleich zur Wirkung von Hyaluronidase auf den ΔI_{ENaC} des Wildtyp-ENaC und der Asparagin-Mutanten _____	103
Abb. 53: Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung des IC_{50} für Amilorid _____	104
Abb. 54: Statistischer Vergleich der IC_{50} für Amilorid _____	105
Abb. 55: Charakterisierung des SK-Effektes an Doppel-Asparagin-Mutanten des $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ _____	106
Abb. 56: Die Mutagenese der Asparagine 312 und 511 der α -Untereinheit in Kombination reduzierte den SK-Effekt des $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ _____	107
Abb. 57: Additive Reduktion des SK-Effektes durch Mutation der Asparagine 312 und 511 _____	107
Abb. 58: Lokalisierung der Asparagine 312 und 511 _____	109
Abb. 59: Homologie-Modell eines αENaC -Trimers _____	110
Abb. 60: Oberflächenstruktur des theoretischen αENaC -Trimers _____	111
Abb. 61: Oberflächenmodell des αENaC -Trimers zur Darstellung der Asparagine 232, 293 und 394 _____	112
Abb. 62: SK-Effekt des HA-getaggtten Wt- $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$, sowie der Asparagin-Einzel-Mutanten $\alpha\text{N312A}\beta\gamma$, $\alpha\text{N511A}\beta\gamma$ und der Doppel-Mutante $\alpha\text{N312+511A}\beta\gamma$ _____	113
Abb. 63: Western Blot zum Nachweis des Glykosylierungsstatus der αENaC -Untereinheit _____	114
Abb. 64: Vergleich des ΔI_{ENaC} vom Wildtyp- $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ und der Doppel-Mutante (N312+511A) in An- und Abwesenheit von Scherkraft _____	116
Abb. 65: Dosis-Wirkungskurve für SK bei Wildtyp-ENaC und Doppel-Mutante _____	117
Abb. 66: Einzelkanalableitungen des Wildtyp- $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ in der Cell Attached Konfiguration bei verschiedenen Membranspannungen _____	118
Abb. 67: I/V-Kurven für den Wildtyp $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$, sowie die Doppel-Mutante $\alpha\text{N312+511A}\beta\gamma$ _____	118
Abb. 68: Sequence Alignment der α - und $\delta 1\text{ENaC}$ -Untereinheit _____	120
Abb. 69: Der SK-induzierte Aktivierung des $\delta 1\text{ENaC}$ wird durch die Mutation potenzieller Glykosylierungsstellen nicht beeinflusst _____	121
Abb. 70: Homologie-Modell eines $\delta 1\text{ENaC}$ -Trimers _____	122
Abb. 71: Homologie-Modell der αENaC -Untereinheit _____	125
Abb. 72: Modell zur Scherkraft-induzierten Beeinflussung des ENaC-gatings _____	128
Abb. 73: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der endothelialen Glykokalyx _____	129
Abb. 74: Struktur eines Proteoglykan-Aggregates _____	133
Abb. 75: Hypothetisches Modell zur SK-Detektion des $\alpha\beta\gamma\text{ENaC}$ über die Asparagine 312 und 511 _____	138

3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammensetzung der Lösungen zur Vereinzelung und Kultivierung der Oozyten	21
Tab. 2:	Restriktionsansatz zur Linearisierung der Plasmide mit BamHI	29
Tab. 3:	Probenansatz für die Gelelektrophorese	31
Tab. 4:	Probenansatz zur in vitro Transkription	32
Tab. 5:	Probenansatz zur elektrophoretischen Kontrolle der in vitro Transkription	33
Tab. 6:	Ansatz des RNA-Markers	33
Tab. 7:	Primersequenzen für die Mutation des humanen α ENaC	37
Tab. 8:	Primersequenzen für die Mutation des humanen δ 1ENaC	38
Tab. 9:	Proben-Ansatz für Mutagenese-PCR	38
Tab. 10:	Reaktionsansatz für die Deglykosylierung mit PNGase F	45
Tab. 11:	Reaktionsansatz für die Deglykosylierung mit Hyaluronidase	45
Tab. 12:	Zusammensetzung des SDS-Trenngels	47
Tab. 13:	Zusammensetzung des SDS-Sammelgels	47
Tab. 14:	Zusammensetzung des Lysepuffers	49
Tab. 15:	Zusammensetzung des 10x SDS-Running Buffers	49
Tab. 16:	Zusammensetzung des 10x Blotting Buffers	50
Tab. 17:	Zusammensetzung des 10x TBS	50
Tab. 18:	Zusammensetzung der ECL-Lsg A	51
Tab. 19:	Zusammensetzung der ECL-Lsg B	51
Tab. 20:	Zusammensetzung der Ringerlösung für Oozyten (ORi)	58
Tab. 21:	Zusammensetzung der extrazellulär-analogen Lösung	64
Tab. 22:	Zusammensetzung der intrazellulär-analogen Lösung	65
Tab. 23:	Absolute Stromwerte (I_M) des δ 1- und δ 2 $\beta\gamma$ ENaC bei schrittweiser Erhöhung der extrazellulären Na^+ -Konzentration	76
Tab. 24:	Einzelkanal-Charakteristika des Wildtyps- $\alpha\beta\gamma$ ENaC und der Doppel-Mutante α N312+511A $\beta\gamma$	119
Tab. 25:	Normalisierte SK-Effekte der δ 1ENaC-Asparagin-Mutanten	121

4 Sequenzen und Alignments

4.1 α ENaC human (Wildtyp)

NCBI Reference Sequence: NM_001038.5

```

ATGGAGGGGAACAAGCTGGAGGAGCAGGACTCTAGCCCTCCACAGTCCACTCCAGGGCTCATGAAGGGGAACAAGCGTGAG
GAGCAGGGGCTGGGCCCCGAACCTGCGGGCGCCCCAGCAGCCCACGGCGGAGGAGGAGGCCCTGATCGAGTTCCACCCTCC
TACCGAGAGCTCTCGAGTTCTTCTGCAACAACACCACCATCCACGGCGCCATCCGCCTGGTGTGCTCCCAGCACAAACCGC
ATGAAGACGGCCCTTCTGGGCAGTGCTGTGGCTCTGCACCTTTGGCATGATGTACTGGCAATTGGCCCTGCTTTTCGGAGAG
TACTTCAGCTACCCCGTCAGCTCAACATCAACCTCAACTCGGACAAGCTCGTCTTCCCCGCAGTGACCATCTGCACCCCTC
AATCCCTACAGGTACCCGAAATTAAGAGGAGCTGGAGGAGCTGGACCGCATCACAGAGCAGACGCTCTTTGACCTGTAC
AAATACAGCTCCTTACCACCTCTCGTGGCCGGCTCCCGCAGCCGTCGCGACCTGCGGGGGACTCTGCCGACCCCTTGACG
CGCTGAGGGTCCCGCCCCGCTCACGGGGCCCGTCGAGCCCGTAGCGTGGCTCCAGCTTGGGGACAACAACCCCCAG
GTGGACTGGAAGGACTGGAAGATCGGCTTCCAGCTGTGCAACCAGAACAATCGGACTGCTTCTACCAGACATACTCATCA
GGGTGGATGCGGTGAGGGAGTGGTACCGCTTCCACTACATCAACATCCTGTGCGAGGCTGCCAGAGACTCTGCCATCCCTG
GAGGAGGACACGCTGGGCAACTTCATCTTCGCCCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCCTGCAACCAGGCGAATTACTCTCACTTC
CACCACCCGATGTATGGAACCTGCTATACTTCAATGACAAGAACAACCTCAACCTCTGGATGTCTCCATGCCTGGAATC
AACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCGCAGAGCAGAATGACTTCATTCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGGTA
ATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGGCGCTGGCGTGGAGACCTCCATCAGC
ATGAGGAAGGAAACCTGGACAGACTTGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGAAATGGCAGTGATGTTCCTGTTGAGAAC
CTTTACCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTATTCACCTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTGCC
TACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTTCTGGGGTACTGCTACTATAAG
CTCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAGCTC
TCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCAGGAATGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACAATTACACC
GTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTCTGAGTCTCC
TCTGTACGATGGTACCCCTCCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGCTCCTCGGTGTTGTCTGTGGTG
GAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCATGTTCCATGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGGTCT
CCAGGCCGAGGGGCGAGGGTGTCCAGGAGGTAGCCTCCACCCTGGCATCCTCCCTCCTTCCCCTTCTGCCCCACCCC
ATGTCTCTGTCTTGTCCCAGCCAGGCCCTGCTCCCTCTCCAGCCTTGACAGCCCCCTCCCCCTGCCTATGCCACCCCTGGGC
CCCCGCCATCTCCAGGGGGCTCTGCAGGGGCCAGTTCCTCCACCTGTCTCTGGGGGGCCCTGA

```

Zur Überprüfung der zielgerichteten Mutagenese wurde die Sequenz der mutmaßlich mutierten Plasmide jeweils gegen die Sequenz der eingesetzten Mutagenese-Primer (welche die genetische Information für die Mutation tragen) *alignt*. Eine vollständige Sequenzübereinstimmung bestätigte daher die erfolgreich durchgeführte Mutagenese.

4.2 α ENaC Asparagin-Mutanten

4.2.1 α ENaC_N232A

GGCTCCGCAGCCGTCGCGACCTGCGGGGACTCTGCCGACCCCTTGACGCGCCTGAGGGTCCCGCCCCGCTCACGGGG
 CCGTTCGAGCCCGTAGCGTGGCTCCAGCTTGCAGGACAAACACCCAGGTGGACTGGAAGGACTGGAAGATCGGCCTCC
 AGCTGTGAACACAGGCCAAATCGGACTGCTTCTACCAGACATACTCATCAGGGGTGGATGCGGTGAGGGAGTGGTACCCT
 TCCACTACATCAACATCCTGTGAGGCTGCCAGAGACTCTGCCATCCCTGGAGGAGGACACGCTGGCAACTTCATCTTCG
 CCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCCTGCAACCAGGCGAATTACTCTCACTTCCACCACCCGATGTATGAAAAGTGTATACTT
 TCAATGACAAGAACAACCTCAACCTCTGGATGTCTCCATGCCATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAG
 AGCAGAATGACTTCATTCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGGGTAATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTA
 TGGATGATGGTGGCTTTAACTTGGCGCTGGCGTGGAGACCTCCATCAGCATGAGGAAGGAAACCTGGACAGACTTGGGG
 GCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGTGTTTCTGTTGAGAACCTTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGT
 GTATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTGCCTACATCTTCTATCCGCGCCCCAGAACGTGG
 AGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTTCTGGGGTACTGCTACTATAAGCTCCAGGTTGACTTCTCTCAGACCACCTGG
 GCTGTTTACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAGCTCTCTGCTGGTACT

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_232):

α ENaC_N232A	AACCCCGAGGTGGACTGGAAGGACTGGAAGATCGGCTTCCAGCTGTGCAACCAGGCCA	178
Mut_232	-----CTTCCAGCTGTGCAACCAGGCCA *****	21
α ENaC_N232A	AATCGGACTGCTTCTACCAGACATACTCATCAGGGGTGGATGCGGTGAGGGAGTGGTA	238
Mut_232	AATCGGACTGCTTCTAC----- *****	38

4.2.2 α ENaC_N293A

GCATCCCTGGAGGAGGACACGCTGGGCAACTTCATCTTCCGCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCCTGCAACCAGGCGGCTTAC
 TCTCACTTCCACCACCCGATGTATGAAAAGTGTATACTTTCAATGACAAGAACAACCTCAACCTCTGGATGTCTTCCATG
 CCTGGAATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGAATGACTTCAATCCCTGCTGCCACAGTGACTGGG
 GCGCGGGTAATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGGCGCTGGCGTGGAGACC
 TCCATCAGCATGAGGAAGGAAACCTGGACAGACTTGGGGCGGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGTGTTTCT
 GTTGAAGACCTTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGT
 GGCTGTGCCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCTGGGGGTACTGC
 TACTATAAGCTCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGCGTGACCAGC
 TACCAGCTCTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAAC
 AATTACACCGTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTCT
 GAGTCTCCCTCTGTCACGATGGTCAACCTGTGACGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGCTCCTCGGTGTTG
 TCTGTGGTGGAG

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_293):

α ENaC_N293A	GCATCCCTGGAGGAGGACACGCTGGGCAACTTCATCTTCCGCTGCCGCTTCAACCAGGTC	60
Mut_293	-----TC **	2
α ENaC-N293A	TCCTGCAACCAGGCGGCTTACTCTCACTTCCACCACCCGATGTATGAAAAGTGTATACT	120
Mut_293	TCCTGCAACCAGGCGGCTTACTCTCACTTCCACC----- *****	36

4.2.3 α ENaC_N312A

CACCACCCGATGTATGGAAGTCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGAAATCA
 ACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCTGCTGCCACAGTGACTGGGGCCCGGTTAA
 TGGTGACACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGGCCTGGCGTGGAGACCTCCATCAGCA
 TGAGGAAGGAAACCTGGACAGACTTGGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTTCTGTGAGAACC
 TTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTGCCT
 ACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCTGGGGGTACTGCTACTATAAGC
 TCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAGCTCT
 CTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACAATTACACCG
 TCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTCTGAGTCTCCCT
 CTGTACAGATGGTCAACCTCCTGTCCAACCTGCGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGCTCCTCGGTGTTGTCTGTGGTGG
 AGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCATGTTTCTCATGCTGCTCCGAAGGTTT

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_312)

α ENaC_N312A	CACCACCCGATGTATGGAAGTCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGA	60
Mut_312	-----TGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGA	40

α ENaC_N312A	TGCTTCCATGCCTGGAATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGAATG	120
Mut_312	TGTC-----	44

4.2.4 α ENaC_N397A

CTTACCACCCGATGTATGGAAGTCTATACTTTCAATGACAAGAACAACCTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGAA
 TCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCTGCTGCCACAGTGACTGGGGCCCGGG
 TAATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGGCCTGGCGTGGAGACCTCCATCA
 GGATGAGGAAGGAAACCTGGACAGACTTGGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGGCTGGCAGTGATGTTCTGTGAGA
 ACCTTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTG
 CCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCTGGGGGTACTGCTACTATA
 AGCTCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTACCAGTGCCGGAAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAGC
 TCTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACAATTACA
 CCGTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTCTGAGTCTC
 CCTCTGTCACGATGGTCAACCTCCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGCTCCTCGGTGTTGTCTGTGG
 TGAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCATGTTTCTCATGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACCTGGT
 CTCCAGGCCGAGGGGCAGGTTGCTCAGGAGGTAGCTCCACCTGGCATCCTCCTCCTTCCCCTTCTGCCCCACCCCA
 TGCTCTGTCTTG

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_397):

α ENaC_N397A	TCAGCATGAGGAAGGAAACCTGGACAGACTTGGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGG	300
Mut_397	-----ATGGCGACTGCACCAAGG	18

α ENaC_N397A	CTGGCAGTGATGTTCTGTGAGAACCTTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTA	360
Mut_397	CTGGCAGTGATGTTCTGTG-----	36

4.2.5 α ENaC_N511A

TTCACCACCCGATGTATGGAACTGCTATACTTTCAATGACAAGAACAACCTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGAAT
CAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCTCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGGT
AATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGGCCTGGCGTGGAGACCTCCATCAG
CATGAGGAAGGAAACCTGGACAGACTTGGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTTCTGTGAGAA
CCTTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTGC
CTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCTGGGGTACTGCTACTATAA
GCTCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTACCAGTGCAGGAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAGCT
CTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACGCTTACAC
CGTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTCTGAGTCTCC
CTCTGTACGATGGTCAACCTCCTGTCCAACCTGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGCTCCTCGGTGTTGTCTGTGGT
GGAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTTCATCATGTTCCCTCATGCTGCTCCGAAATT

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_511):

α ENaC_N511A	ATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACGCTTACACCGTCAACAACAA	660
Mut_511	-----GATGCTATCGCGACAGAACGCTTACACCGTCAACAACAA *****	39
α ENaC_N511A	GAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTTC	720
Mut_511	G----- *	40

4.2.6 α ENaC_N312+293A

CATCCTGGAGGAGGAACGCTGGGCAACTTCATCTTCGCCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCCTGCAACCAGGCGGCTTACTCT
CACTTCCACCACCCGATGTATGGAACTGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCT
GGAATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCTCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCC
CGGGTAATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGGCCTGGCGTGGAGACCTCC
ATCAGCATGAGGAAGGAAACCTGGACAGACTTGGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTTCTCTGTT
GAGAACCTTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGC
TGTGCCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCTGGGGGTACTGCTAC
TATAAGCTCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTCAACCAAGTGCAGGAGCCATGCAGCGTGACCAGCTAC
CAGCTCTCTGCTGGTTACTCAGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACAAT
TACTGTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTCTGAG
TCTCCCTCTGTACGATGGTCAACCTCCTGTCCAACCTGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGCTCCTCGGTGTTGTCTG
TGGGTGGA

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_312 und Mut_293):

Mut_293	-----TCTCC	5
α ENaC_N312+293A	CATCCTGGAGGAGGAACGCTGGGCAACTTCATCTTCGCCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCC	60
Mut_312	----- *****	0
Mut_293	TGCAACCAGGCGGCTTACTCTCACTTCCACC-----	36
α ENaC_N312+293A	TGCAACCAGGCGGCTTACTCTCACTTCCACCACCCGATGATGGAACTGCTATACTTTC	120
Mut_312	-----TGCTATACTTTC *****	12
Mut_293	-----	36
α ENaC_N312+293A	AATGACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGAATCAACAACGGTCTG	180
Mut_312	AATGACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGATGTC----- *****	44

4.2.7 α ENaC_N312+397A

TTCACCACCCGATGTATGGAAACTGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGAA
 TCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCCCTGTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGGG
 TAATGGTGACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGGCCTGGCGTGGAGACCTCCATCA
 GCATGAGGAAGGAAACCCTGGACAGACTTGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGGCTGGCAGTGATGTTCCCTGTTGAGA
 ACCTTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTATTCACTCCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTG
 CCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCCTGGGGTACTGCTACTATA
 AGCTCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTACCAGGAGTCCGGAAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAGC
 TCTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACAATTACA
 CCGTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTCTGAGTCTC
 CCTCTGTACGATGGTCACCCCTCCTGTCCAACCTGCGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGCTCCTCGGTGTTGTCTGTGG
 TGGAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCATGTTCCCTCATGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGGT
 CTCACAGGGCGAGGGGCAGGGGTGCTCAGAG

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_312 und Mut_397):

Mut_312	-----TGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCT	37
α ENaC_N312+397A	TCACCACCCGATGTATGGAAACTGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCT	60
Mut_397	-----	0

Mut_312	GGATGTC-----	44
aENaC_N312+397A	GGATGTCTTCCATGCCTGGAATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGA	120
Mut_397	-----	0

Mut_312	-----	44
aENaC_N312+397A	ATGACTTCATTCCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGGTAATGGTGCACGGGCAGG	180
Mut_397	-----	0
Mut_312	-----	44
aENaC_N312+397A	ATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGGCCTGGCGTGGAGACCTCCA	240
Mut_397	-----	0
Mut_312	-----	44
aENaC_N312+397A	TCAGCATGAGGAAGGAAACCCTGGACAGACTTGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGG	300
Mut_397	-----ATGGCGACTGCACCAAGG	18

Mut_312	-----	44
aENaC_N312+397A	CTGGCAGTGATGTTCCCTGTTGAGAACCTTTACCCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTA	360
Mut_397	CTGGCAGTGATGTTCCCTG-----	36

4.2.8 α ENaC_N312+511A

CTTCACCACCCGATGTATGGAAGTGTACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGAA
 TCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCCCTGCTGTCCACAGTACTGGGGCCCGGG
 TAATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGGCCTGGCGTGGAGACCTCCATCA
 GCATGAGGAAGGAAACCCTGGACAGACTTGGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTTTCTGTTGAGA
 ACCTTTACCCCTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTG
 CCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCTGGGGTACTGCTACTATA
 AGCTCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTACCAGTGCAGGAAAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAGC
 TCTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACGCTTACA
 CCGTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACACAAAACCAATTCTGAGTCTC
 CCTCTGTACAGATGGTCACCCCTCCTGTCCAACCTGCGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGCTCCTCGGTGTTGCTGTGG
 TGGAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCATGTTCTCATGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGGT
 CTCAGGCCGAGGGGCGAGGGGTGCTCAGGAGGTAGCCTCCACCTGGCATCCTC

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_312 und Mut_511):

Mut_312	-----TGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCT	37
α ENaC_N312+511A	CTTCACCACCCGATGTATGGAAGTGTACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCT	60
Mut_511	-----	0

Mut_312	GGATGTC-----	44
α ENaC_N312+511A	GGATGTCTTCCATGCCTGGAATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGA	120
Mut_511	-----	0

Mut_312	-----	44
α ENaC_N312+511A	ATGACTTCATTCCCCTGCTGTCCACAGTACTGGGGCCCGGTAATGGTGCACGGGCAGG	180
Mut_511	-----	0
Mut_312	-----	44
α ENaC_N312+511A	ATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGGCCTGGCGTGGAGACCTCCA	240
Mut_511	-----	0
Mut_312	-----	44
α ENaC_N312+511A	TCAGCATGAGGAAGGAAACCCTGGACAGACTTGGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGA	300
Mut_511	-----	0
Mut_312	-----	44
α ENaC_N312+511A	ATGGCAGTGATGTTCTGTTGAGAACCTTTACCTTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGTA	360
Mut_511	-----	0
Mut_312	-----	44
α ENaC_N312+511A	TTCACCTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTGCCTACATCTTCTATC	420
Mut_511	-----	0
Mut_312	-----	44
α ENaC_N312+511A	CGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCTGGGGTACTGCT	480
Mut_511	-----	0
Mut_312	-----	44
α ENaC_N312+511A	ACTATAAGCTCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTACCAAGTGCCGGA	540
Mut_511	-----	0
Mut312	-----	44
α ENaC_N312+511A	AGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAGTCTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGA	600
Mut511	-----	0
Mut312	-----	44
α ENaC_N312+511A	CATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACGCTTACACCGTCAACAACA	660
Mut511	-----GATGCTATCGCGACAGAACGCTTACACCGTCAACAACA	38

Mut312	-----	44
α ENaC_N312+511A	AGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACACAAAACCAATT	720
Mut511	AG-----	40
	**	

4.2.9 N232+312+511A

TCTCGTGGCGGCTCCCGCAGCCGTCGCGACCTGCGGGGGACTCTGCCGCACCCCTTGCAGCGCCTGAGGGTCCC GCCCCCG
 CCTCACGGGGCCCGTCGAGCCCGTAGCGTGGCCTCCAGCTTGGGGACAACAACCCAGGTGGACTGGAAGGACTGGAAG
 ATCGGCTTCCAGCTGTGCAACCAGGCCAAATCGGACTGCTTCTACCAGACATACTCATCAGGGGTGGATGCGGTGAGGGAG
 TGGTACCGCTTCCACTACATCAACATCCTGTGCGAGGCTGCCAGAGACTCTGCCATCCCTGGAGGAGGACACGCTGGGCAAC
 TTCATCTTCGCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCCTGCAACCAGGCGAATTACTCTCACTTCCACCACCCGATGTATGGAAAC
 TGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGATGCTTCCATGCCGGAATCAACAACGGTCTGTCCCTGATG
 CTGCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGGTAATGGTGACGGGCAGGATGAA
 CCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGGCGCCTGGCGTGGAGACCTCCATCAGCATGAGGAAGGAAACCCCTGGAC
 AGACTTGGGGCCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTTCTGTGAGAACCCTTACCCTTCAAAGTACACA
 CAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGCTTCCAGGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTGCTACATCTTCTATCCGCGGCC
 CAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCTGGGGTACTGCTACTATAAGCTCCAGGTTGACTTCTCCTCA
 GACCACCTGGGCTGTTTACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAGCTCTCTGCTGGTTACTCACGATGG
 CCTCGG

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_232, Mut_312 und Mut_511):

αENaC_N232+312+511A	TTGCGGGACAACAACCCCGAGGTGGACTGGAAGGACTGGAAGATCGGCTTCCAGCTGTGC	180
Mut_232	-----CTTCCAGCTGTGC	13
Mut_312	-----	0
Mut_511	-----	0

αENaC_N232+312+511A	AACCAGGCCAAATCGGACTGCTTCTACCAGACATACTCATCAGGGGTGGATGCGGTGAGG	240
Mut_232	AACCAGGCCAAATCGGACTGCTTCTAC-----	40
Mut_312	-----	0
Mut_511	-----	0

αENaC_N232+312+511A	GAGTGGTACCGCTTCCACTACATCAACATCCTGTGCGAGGCTGCCAGAGACTCTGCCATCC	300
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----	0
Mut_511	-----	0
αENaC_N232+312+511A	CTGGAGGAGGACACGCTGGGCAACTTCATCTTCGCTGCCGCTTCAACCAGGTCTCCTGC	360
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----	0
Mut_511	-----	0
αENaC_N232+312+511A	AACCAGGCCAATTACTCTCACTTCCACCACCCGATGTATGGAAACTGCTATACTTTCAAT	420
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----TGCTATACTTTCAAT	15
Mut_511	-----	0

αENaC_N232+312+511A	GACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGAATCAACAACGGTCTGTCC	480
Mut_232	-----	40
Mut_312	GACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGATGTC-----	44
Mut_511	-----	0

αENaC_N232+312+511A	CTGATGCTGCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCC	540
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----	44
Mut_511	-----	0
αENaC_N232+312+511A	CGGGTAATGGTGACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTG	600
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----	44
Mut_511	-----	3
αENaC_N232+312+511A	CGGCCTGGCGTGGAGACCTCCATCAGCATGAGGAAGGAAACCCCTGGACAGACTTGGGGCC	660
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----	44
Mut_511	-----	0
αENaC_N232+312+511A	GATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTTCTGTGAGAACCCTTACCCTTCA	720
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----	44
Mut_511	-----	0

αENaC_N232+312+511A	AAGTACACACAGCAGGTGTGTATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGT	780
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----	44
Mut_511	-----	0
αENaC_N232+312+511A	GGCTGTGCCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAG	840
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----	44
Mut_511	-----	0
αENaC_N232+312+511A	CACAGTTCCTGGGGTACTGCTACTATAAGCTCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTG	900
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----	44
Mut_511	-----	0
αENaC_N232+312+511A	GGCTGTTTACCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAGCTCTCTGCTGGT	960
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----	44
Mut_511	-----	0
αENaC_N232+312+511A	TACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAG	1020
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----	44
Mut_511	-----GATGCTATCGCGACAG	16

αENaC_N232+312+511A	AACGCTTACACCGTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAG	1080
Mut_232	-----	40
Mut_312	-----	44
Mut_511	AACGCTTACACCGTCAACAACAAG-----	40

4.3 HA- α ENaC human (C-Terminus, Wildtyp)

ACTCTTCTTCAGGAGCTGACTACAAAACCAATTCTGAGTCTCCCTCTGTACACGATGGTCACCCTCCTGTCCAACCTGGGCA
 GCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGCTCCTCGGTGTGTCTGTGGTGGAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCA
 TGTTCCTCATGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGGTCTCCAGGCCGAGGGGGCAGGGGTGCTCAGGAGGTAGCCT
 CCACCCCTGGCATCCTCCCCTCCTTCCCCTTCTGCCCCACCCCATGTCTCTGTCTTGTCCCAGCCAGGCCCTGCTCCCT
 CTCCAGCCTTGACAGCCCCTCCCCTGCCTATGCCACCCTGGGCCCCCGCCATCTCCAGGGGGCTCTGCAGGGGCCAGTT
 CCTCCGCTGTCTCTGGGGGGCCCTACCCATATGACGTTCCAGACTACGCCTGAAAGGGCGAATTCACGCGTGGTACCT
 CTAGAGTCGACCCGGCGGCCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Alignment gegen Sequenz für HA-tag

HA- α ENaC	TGGGGGGCCCTACCCATATGACGTTCCAGACTACGCCTGAAAGGGCGAATTCACGCGTG	480
HA-tag	-----TACCCATATGACGTTCCAGACTACGCC-----	27

4.4 HA- α ENaC Asparagin-Mutanten

4.4.1 HA- α ENaC_N312A

CTTCACCACCCGATGTATGGAAACTGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGA
 ATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCCCTGCTGTCCACAGTACTGGGGCCCGG
 GTAATGGTGCACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGGCCCTGGCGTGGAGACCTCCATC
 AGCATGAGGAAGGAAACCCTGGACAGACTTGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGTGTTCTGTGAG
 AACCTTTACCCCTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGT
 GCCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCCTGGGGTACTGCTACTAT
 AAGTCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTCCCAAGTGCCGGAAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAG
 CTCTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACAATTAC
 ACCGTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAACTACAAAACCAATTCTGAGTCT
 CCTCTGTACGATGGTACCCCTCCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGTCTCGGTGTTGTCTGTG
 GTGGAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCATGTTCCATGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGG
 TCTCAGGGCGAA

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_312)

HA- α ENaC_N312A	CTTCACCACCCGATGTATGGAAACTGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTC	60
Mut_312	-----TGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTC	36

HA- α ENaC_N312A	TGGATGTCTTCCATGCCTGGAATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAG	120
Mut_312	TGGATGTC-----	44

4.4.2 HA- α ENaC_N511A

TTCACCACCCGATGTATGGAAACTGCTATACTTTCAATGACAAGAACAACCTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGAA
 TCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGG
 TAATGGTGACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGGCCTGGCGTGGAGACCTCCATCA
 GCATGAGGAAGGAAACCCTGGACAGACTTGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTTCCCTGTTGAGA
 ACCTTTACCCCTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGTG
 CCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCCTGGGGTACTGCTACTATA
 AGCTCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTACCAGTGC CGGAAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAGC
 TCTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACGCTTACA
 CCGTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTCAAGGAGCTGAATACAAAACCAATTCTGAGTCTC
 CCTCTGTACGATGGTCACCCCTCCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGCTCCTCGGTGTTGTCTGTGG
 TGGAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCATGTTCCATGCTGCTCCGAAGGTTCCGAAGCCGATACTGGT
 CTCCAGGCCGAGGGGCAGGGTGTCTCAGGAGGTAGCCTCCACCTGGCATCCTCCCCTCCTTCCCCTTCTGCCACCCC
 ATGTCTCTGTCTT

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_511)

HA- α ENaC_N511A	CTTACCACCCGATGTATGGAAACTGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTC	60
Mut_511	-----TGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTC	36

HA- α ENaC_N511A	TGGATGTCTTCCATGCCTGGAATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAG	120
Mut_511	TGGATGTC-----	44

4.4.3 HA- α ENaC_N312+511A

CTTACCACCCGATGTATGGAAACTGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTCTGGATGTCTTCCATGCCTGGA
 ATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAGAATGACTTCATTCCCCTGCTGTCCACAGTGACTGGGGCCCGG
 GTAATGGTGACGGGCAGGATGAACCTGCCTTTATGGATGATGGTGGCTTTAACTTGCGGCCTGGCGTGGAGACCTCCATC
 AGCATGAGGAAGGAAACCCTGGACAGACTTGGGGCGATTATGGCGACTGCACCAAGAATGGCAGTGATGTTCCCTGTTGAG
 AACCTTTACCCCTCAAAGTACACACAGCAGGTGTGATTCACTCCTGCTTCCAGGAGAGCATGATCAAGGAGTGTGGCTGT
 GCCTACATCTTCTATCCGCGGCCCCAGAACGTGGAGTACTGTGACTACAGAAAGCACAGTTCCCTGGGGTACTGCTACTAT
 AAGCTCCAGGTTGACTTCTCCTCAGACCACCTGGGCTGTTTACCAGTGC CGGAAGCCATGCAGCGTGACCAGCTACCAG
 CTCTCTGCTGGTTACTCACGATGGCCCTCGGTGACATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACGCTTAC
 ACCGTCAACAACAAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTCAAGGAGCTGAATACAAAACCAATTCTGAGTCT
 CCTCTGTACGATGGTCACCCCTCCTGTCCAACCTGGGCAGCCAGTGGAGCCTGTGGTTCGGCTCCTCGGTGTTGTCTGTG
 GTGGAGATGGCTGAGCTCGTCTTTGACCTGCTGGTCATCATGTTCCATGCTGCTCCGAAGTTCGAAGCCGATACTGGT
 CTCCAGGCCGAGGGGCAGGGTGTCTCAGGAGGTAGCCTCCACCTGGCATCCTCCCCTCCTTCCCCTTCTGCCACCCC
 CATGTCTCTGTCTTGTCCCAGCCAGGCCCTGCTCCCTCTCAGCCTTGACA

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_312, Mut_511)

HA- α ENaC_N312+511	ACTTACCACCCGATGTATGGAAACTGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTC	60
Mut_312	-----TGCTATACTTTCAATGACAAGGCCAACTCCAACCTC	36

HA- α ENaC_N312+511	TGGATGTCTTCCATGCCTGGAATCAACAACGGTCTGTCCCTGATGCTGCGCACAGAGCAG	120
Mut_312	TGGATGTC-----	44

HA- α ENaC_N312+511	ACATCCCAGGAATGGGTCTTCCAGATGCTATCGCGACAGAACGCTTACACCGTCAACAAC	660
Mut_511	-----GATGCTATCGCGACAGAACGCTTACACCGTCAACAAC	37

HA- α ENaC_N312+511	AAGAGAAATGGAGTGGCCAAAGTCAACATCTTCTTCAAGGAGCTGAATACAAAACCAAT	720
Mut_511	AAG-----	40

4.5 δ 1ENaC human (Wildtyp)

NCBI Reference Sequence: NM_001130413.3

ATGAGGGCAGTGTGTACAGAAAGACAACACCGCTCCCTCGTTACCTGTGGCCCGGCCACCTCAGCGGCCAAGGAGGCTC
 ACCTGGTCAATGGTGCAGTGACCACAGGACCCCCACATGCCGGGAGCTGGGTTCGCCCCACCCCACCCCCTGCACCGGGCCA
 GCGAGGGGATGGCCAGAAGAGGGGGAGGACCATGTGGATTACACAGTGTGGACATGTGCTCTGTGGCTACCCCCTCTGC
 CTACTCTCTGGCCGATACAGGGGTGTGGGACAGGCTGGGTGACTCCAGCATGGCTTTCCTCTCCAGGACGTCACCGGTG
 GCAGCTGCTTCCCTCCAGAGCCGGCAGGAGGCCAGAGGCTCCATCCTGCTTCAGAGCTGCCAGCTGCCCCCGCAATGGCTG
 AGCACCGAAGCATGGACGGGAGAATGGAAGCAGCCACACGGGGGGCTCTCACCTCCAGATCGCTGGGCCTGTGGCTCCC
 CAGAGGCCCTGCCACCTGAAGGGATGGCAGCACAGACCCACTCAGCACAACGCTGCCTGCAAACAGGGCCAGGCTGCAGCC
 CAGACGCCCCCAGGCCGGGGCCACCATCAGCACCACCACCACCCCAAGGAGGGGCACCAGGAGGGGCTGGTGGAGCTG
 CCCGCTCGTTCGGGAGCTGCTCACCTTCTTCTGCACCAATGCCACCATCCACGGCGCCATCCGCTGGTCTGCTCCCGC
 GGAACCCCTCAAGACGACGCTCCTGGGGCTGCTGTCCCTGGGAGCCCTGGTCGCTGCTGGCAGCTGGGGCTCCTC
 TTTGAGCGTCACTGGCACCGCCCGTCTCATGGCCGTCTCTGTGCACTCGGAGCGCAAGCTGCTCCCGTGGTACCCTG
 TGTGACGGGAACCCACGTCGGCCGAGTCCGGTCTCCGCCATCTGGAGCTGCTGGACGAGTTTGCAGGGAGAACATTGAC
 TCCCTGTACAACGTCACCTCAGCAAAGGCAGAGCCGCCCTCTCCGCCACTGTCCCCGCCACGAGCCCCCTTCCACCTG
 GACCGGGAGATCCGCTCTGCAGAGGCTGAGCCACTCGGGCAGCCGGTCCAGAGTGGGTTCAGACTGTGCAACAGCACGGC
 GCGACTGCTTTTACCGAGGCTACACGTCAGGCGTGGCGGCTGTCCAGGACTGGTACCACCTTCCACTATGTGGATATCCTG
 GCCCTGCTGCCCGCGCATGGGAGGACAGCCACGGGAGCCAGGACGGCCACTTCGTCCTCTCCTGCAGTTACGATGGCCTG
 GACTGCGAGGGCCGACAGTTCCGGACCTTCCACCACCCCACTACGGCAGCTGCTACACGGTCGATGGCGTCTGGACAGCT
 CAGCGCCCCGGCATCACCCACGGAGTCGGCCTGGTCTCAGGGTTGAGCAGCAGCCTCACCTCCCTGCTGTCCACGCTG
 GCCGGCATCAGGGTCATGGTTACGGCCGTAACCACACGCCCTTCTGGGGCACCACAGCTTACAGCTCCGGCCAGGGACG
 GAGGCCACCATCAGCATCCGAGAGGACGAGGTGCACCGGCTCGGGAGCCCTACGGCCACTGCACCGCCGGCGGGGAAGGC
 GTGGAGGTGGAGCTGCTACACAACACCTCCTACACCAGGCAGGCTGCCTGGTGTCTGCTTCCAGCAGCTGATGGTGGAG
 ACCTGCTCCTGTGGCTACTACCTCCACCTCTGCCGGCGGGGGTGGTACTGCAGCTCTGCCCGGCACCCTGCCTGGGGA
 CACTGCTTCTACCGCTTACAGGACCTGGAGACCCACCGCTCCCTGTACCTCCCGTGCCCGAGGCCCTGCAGGGAG
 TCTGCATTCAGCTCTCCACTGGGACCTCCAGGTGGCCTTCCGCCAAGTCAGCTGGATGGACTCTGGCCACGCTAGGTGAA
 CAGGGGCTGCCGCATCAGAGCCACAGACAGAGGAGCAGCCTGGCCAAAATCAACATCGTCTACCAGGAGCTCAACTACCGC
 TCAGTGGAGGAGGCGCCCGTGTACTCGGTGCCGACGCTGCTCTCGGCCATGGGCAGCCTCTGCAGCCTGTGGTTTGGGGCC
 TCCGTCCTCTCCTTCCCTGGAGCTCCTGGAGCTGCTGCTCGATGCTTCTGCCCTCACCTGGTGTAGGCGGCCGCCGCTC
 CGCAGGGCGTGGTTCTCCTGGCCAGAGCCAGCCTGCCTCAGGGGCTCCAGCATCAAGCCAGAGGCCAGTCAGATGCC
 CCGCTGCAGGCGGCACGTCAGATGACCCGGAGCCAGCGGGCTCATCTCCACGGGTGATGCTTCCAGGGGTTCTGGCG
 GGAGTCTCAGCCGAAGAGAGCTGGGCTGGGCCCCAGCCCTTGAGACTCTGGACACCTGA

4.6 δ 1ENaC Asparagin-Mutanten

4.6.1 δ 1ENaC_N166A

CGGTCTCTGTGCACTCGGAGCGCAAGCTGCTCCCGCTGGTACCCCTGTGTGACGGGAACCCACGTCGGCCGAGTCCGGTCC
 TCCGCCATCTGGAGCTGCTGGACGAGTTTGCCAGGGAGAACATTGACTCCCTGTACAACGTCGCCCTCAGCAAAGGCAGAG
 CCGCCCTCTCCGCCACTGTCCCCCGCCACGAGCCCCCTTCCACCTGGACCGGGAGATCCGCTCTGCAGAGGCTGAGCCACT
 CGGGCAGCCGGGTCAGAGTGGGGTTCAGACTGTGCAACAGCACGGGCGGCGACTGCTTTTACCGAGGCTACACGTCAGGCG
 TGGCGGCTGTCCAGGACTGGTACCCTTCCACTATGTGGATATCTGGCCCTGCTGCCCGCGGCATGGGAGGACAGCCACG
 GGAGCCAGGACGGCCACTTCGTCTCTCCTGCAGTTACGATGGCCTGGACTGCCAGGCCGACAGTTCCGGACCTTCCACC
 ACCCCACCTACGGCAGCTGCTACACGGTCGATGGCGTCTGGACAGCTCAGCGCCCCGGCATCACCCACGGAGTCGGCCTGG
 TCCTCAGGGTTGAGCAGCAGCCTACCTCCCTCTGCTGTCCACGCTGGCCGGCATCAGGGTCATGGTTTACCGCCGTAACC
 ACACGCCCTTCTGGGGCACCACAGCTTCAGCGTCCGGCCAGGGACGGAGGCCACCATCAGCATCCGAGAGGACGAGGTGC
 ACCGGCTCGGGAGCCCTACGGCCACTGCACCGCCGGCGGGGAAGGCGTGGAGGTGGAGCTGCTACACAACACCTCTACA
 CCAGGACGGCTGCCTGGTGTCTGCTTCCAGCAGCTGATGGTGGAGACCTGCTCCTGTGGCTACTACCTCCACCCTCTGC
 CGCGGGGGCTGAGTACTGCAGCTCTGCCCGCCACCTGCCTGGGGACACTGCTT

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_166)

δ 1ENaC_N166A	ACATTGACTCCCTGTACAACGTCGCCCTCAGCAAAGGCAGAGCCGCCCTCTCCGCCACTG	180
Mut_166	-----ACTCCCTGTACAACGTCGCCCTCAGCAAAGGCAGAG-----	36

4.6.2 δ 1ENaC_N211A

TGACCGTCTCTGTGCACTCGGAGCGCAAGCTGCTCCCCTGGTACCCCTGTGTGACGGGAACCCACGTCCGGCCGAGTCCGG
 TCCTCCGCCATCTGGAGCTGCTGGACGAGTTTGCAGGGAGAACATTGACTCCCTGTACAACGTCAACCTCAGCAAAGGCA
 GAGCCGCCCTCTCCGCCACTGTCCCCGCCACGAGCCCCCTTCCACCTGGACCGGAGATCCGTCTGCAGAGGCTGAGCC
 ACTCGGGCAGCCGGGTGAGAGTGGGGTTCAGACTGTGCGCCAGCACGGGCGGCGACTGCTTTTACCAGAGGCTACACGTCAG
 GCGTGGCGGCTGTCCAGGACTGGTACCACTTCCACTATGTGGATATCTGGCCCTGTGCCCGCGGCATGGGAGGACAGCC
 ACGGGAGCCAGGACGGCCACTTCGTCTCTCTGCAGTTACGATGGCCTGGACTGCCAGGCCCGACAGTTCCGGACCTTCC
 ACCACCCACCTACGGCAGCTGCTACACGGTGCATGGCGTCTGGACAGCTCAACGCCCGGCATCACCCACGGAGTCCGGC
 TGGTCTCAGGGTTGAACAGCAGCCT

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_211)

```

 $\delta$ 1ENaC_N211A  GCCACTCGGGCAGCCGGGTGAGAGTGGGGTTCAGACTGTGCGCCAGCACGGGCGGCGACT  300
Mut_211        -----GGTTCAGACTGTGCGCCAGCACGGGCGGCG-----  30
                *****
  
```

4.6.3 δ 1ENaC_N384A

CACCCACCTACGGCAGCTGCTACACGGTGCATGGCGTCTGGACAGCTCAGCGCCCCGGCATCACCCACGGAGTCCGGCCTG
 GTCCTCAGGGTTGAGCAGCAGCCTCACCTCCCTCTGCTGTCCACGCTGGCCGGCATCAGGGTCATGGTTCACGGCCGTAAC
 CACACGCCCTTCTGGGGCACCACAGCTTCAGCGTCCGGCCAGGACGGAGGCCACCATCAGCATCCGAGAGGACGAGGTG
 CACCGGCTCGGGAGCCCCCTACGGCCACTGCACCGCCGGCGGGGAAGGCGTGGAGGTGGAGCTGCTACACGCCACCTCCTAC
 ACCAGGCAGGCCTGCCTGGTGTCTGCTTCCAGCAGCTGATGGTGGAGACCTGCTCCTGTGGCTACTACCTCCACCCCTG
 CCGGCGGGGGCTGAGTACTGCAGCTCTGCCCGGCACCCTGCCCTGGGGACACTGCTTCTACCGCCTTACCAGGACCTGGAG
 ACCACCGGCTCCCTGTACCTCCCGCTGCCCCAGGCCCTGCAGGGAGTCTGCATTCAAGCTCTCCACTGGGACCTCCAGG
 TGGCCTTCGCCAAGTCAGCTGGATGGACTCTGGCCAGCTAGGTGAACAGGGGCTGCCGCATCAGAGCCACAGACAGAGG
 AGCAGCCTGGCCAAAATCAACATCGTCTACCAGGAGCTCAACTACCGCTCAGTGGAGGAGGCGCCCGTGTACTCGGTGCCG
 CAGCTGCTCTCGGCCATGGGCAGCCTCTGCAGCCTGTGGTTTGGGGCCTCCGTCTCTCCCTCCTGGAGCTCCTGAG

Alignment gegen Mutagenese-Primer (Mut_384)

```

 $\delta$ 1ENaC_N384A  GCGTGGAGGTGGAGCTGCTACACGCCACCTCCTACACCAGGCAGGCCTGCCTGGTGTCTCT  300
Mut_384        -----GGTGGAGCTGCTACACGCCACCTCCTACACCAGG-----  34
                *****
  
```

5 Abkürzungsverzeichnis

5.1 Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ami	Amilorid
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> , Varianzanalyse bei Vergleich mehrerer, unabhängiger Stichproben
APS	Ammonium Persulfat
ASIC	<i>Acid Sensing Ion Channel</i>
ASL	<i>Airway surface liquid</i>
Asn, N	Asparagin
Asn-Mutante	Asparagin-Mutante des ENaC, bei der ein Asparagin gegen ein Alanin substituiert wurde
ATP	Adenosintriphosphat
ATPasen	Enzyme, die ATP erzeugen oder verbrauchen
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
Ca ²⁺ -freier Ori	Kalzium-freier Oozyten-Ringer
ca.	circa
CF	Cystische Fibrose, Mukoviszidose
cDNA	complementary-DNA, Intron-freie DNA-Sequenz
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Cl ⁻	Chlorid-Ion
cRNA	complementary-RNA, codierende, revers transkribierte RNA mit Poly(A) und Trimethyl G-Cap
C-Terminus	Carboxyl-Terminus eines Peptides
DEG	Degenerin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
Dev.	Devitellinisierte Oozyte
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-Wasser
d.h.	das heißt
ΔI_{ENaC}	ENaC-vermittelter Strom

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	(<i>Enhanced chemiluminescence</i>)-Substratlösung
ED	Extrazelluläre Domäne
engl.:	englisch für
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'- Tetraessigsäure
ENaC	Epithelialer Na ⁺ -Kanal
et al.	und andere
EZM	Extrazelluläre Matrix
FaNaCh	<i>FMRFamide peptide-gated Na⁺-channel</i>
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
H ⁺	Wasserstoff-Ion, Proton
HA-tag	Hämagglutinin-Epitop
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCO ₃ ⁻	Hydrogenkarbonat-Ion
hENaC	Humaner epithelialer Na ⁺ -Kanal
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2- ethansulfonsäure
HPO ₄ ²⁻	Hydrogenphosphat-Ion
Hyal.	Hyaluronidase
I	Strom
IC ₅₀	Inhibitionskoeffizient
I _{Komp}	Kompensationsstrom
I _M	transmembraner Strom
I _{Ami}	Reststrom unter Amilorid
g	Erdbeschleunigung
K ⁺	Kalium-Ion
kb	kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KuORi	Kultur-Oozyten-Ringer
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> , Nährmedium für Bakterien
MEC	Gen des Nematoden <i>Caenorhabditis elegans</i> ,

	dass für mechanosensitive Proteine kodiert
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
n	Anzahl der Versuche
N	Anzahl der Donoren
Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
Nedd4	Ubiquitin Protein-Ligase
NMDG	N-Methyl-D-Glukamin
NMDG-KuORI	N-Methyl-D-Glukamin-Kultur- Oozytenringer
NP-40	nonyl phenoxyethoxyethanol 40
N-Terminus	Amino-Terminus eines Peptids
ORi	Oozyten-Ringer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	<i>Polymerase-chain-reaction</i>
PHA-1	Pseudohypoaldosteronismus Typ 1
PY-Motiv	Aminosäureabschnitt mit charakteristischer Abfolge von Prolin (P) und Tyrosin (T)
Ref	Referenzelektrode
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease, die Ribonukleinsäuren spaltet
rNTP	Ribonuklein-Triphosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
Ser	Serin
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SK	Scherkraft
SK-Effekt	Scherkraft-Effekt
sog.	sogenannt€
SO ₄ ²⁻	Sulfat-Ion
Tab.	Tabelle

TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Thr	Threonin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEVC	Two-Electrode-Voltage-Clamp
TM	Transmembran-Domäne
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U/ml	Einheiten eines Enzyms pro Milliliter
U	Spannung, Potential
U_{Ist}	Membranpotential
U_{Soll}	vorgegebene klemmspannung
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
v.a.	vor allem
VE-H ₂ O	entmineralisiertes Wasser
Wt	Wildtyp
rpm	Umdrehung pro Minute
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
z.B.	Zum Beispiel

5.2 Größenordnungen

G	giga	(10 ⁹)
M	mega	(10 ⁶)
k	kilo	(10 ³)
c	centi	(10 ²)
m	milli	(10 ⁻³)
μ	mikro	(10 ⁻⁶)
n	nano	(10 ⁻⁹)
p	pico	(10 ⁻¹²)

5.3 Einheiten

A	Ampere
° C	Grad Celsius
g	gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
l	Liter
M	Molar
m	meter
min	Minute
U	<i>Unit</i>
V	Volt
sec	Sekunde
Ω	Ohm
%	Prozent

6 Verwendete Chemikalien/Pharmaka und deren Bezugsquellen

Substanz	Firma	Bestellnummer
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung, 30%, (37.5:1)	Roth	3029.2
Agarose NEE0	Roth	2267.2
Amilorid	Sigma-Aldrich	A7410
Antikörper Rabbit anti-Mouse-IGG (H+L)	ThermoFisher Scientific	31450
APS, Ammonium Persulfate	BIO-RAD	M5940
BamHI	Biolabs	R3136T
Bradford-Reagenz	Appllichem	A6932
BSA	Sigma	A2153
CaCl ₂	Roth	5239.2
DEPC	Sigma-Aldrich	D5758
DMSO	Appllichem	A3672
DNA Ladder 1 kb	Biomol	10004
EDTA	Sigma	EDFS
EGTA	Sigma	E4378
Elastase	Sigma-Aldrich	E1250
Entwickler	Sigma-Aldrich	P7042-1GA
Ethanol	Sigma-Aldrich	24102
Fixierer	Sigma-Aldrich	P7167-1GA
HA Epitope Tag Antibody	ThermoFisher Scientific	26183
HCl	Fluka	84421
Hepes	Sigma-Aldrich	9105.3
Hyperfilm ECL, 18x24	Amersham	28-9068-36
α -D(+)-Glucose Monohydrat	Roth	6780-1
Glycin	Roth	3908.2
H ₂ O ₂ , Wasserstoffperoxid, 35 %	Merck	108.600
HEPES	Sigma-Aldrich	9105.3
Hyaluronidase, 300 U/mg	Roth	9980.2
KCl	Roth	6781.1
Kollagenase NB 4	Serva	17454
LB-Broth	Sigma-Aldrich	L3022
Luminol, 97%	Sigma-Aldrich	123072
D-Mannitol	Sigma-Aldrich	M4125

Substanz	Firma	Bestellnummer
Methanol	Sigma-Aldrich	32.213
<i>Midori Green Advance</i>	Biozym	617004
<i>Midori Green Direct</i>	Biozym	617006
Mineralöl	Sigma-Aldrich	M8691
<i>Mini Quick Spin RNA Columns</i>	Roche	11814427001
MgCl ₂	Roth	KK36.2
NaCl	Roth	3957.1
Na ⁺ -Pyruvat	Applichem	A1530
Nitrocellulose Membran 0,45 µm	BIO-RAD	162-0113
NMDG	Sigma-Aldrich	M2004
Para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich	C9008
Penicillin G	Sigma-Aldrich	13752-5g-F
<i>PerfectPrep Miniprep Kit</i>	5Prime	PRME2300100
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, 25:24:1	Applichem	A0889
<i>Phase lock gel tubes</i>	5PRIME	2302800
PNGase F	Biolabs	P0704S
<i>Protein Standard Dual Color Precision Plus</i>	BIO-RAD	161-0374
<i>QuikChange Lightning Site-directed Mutagenesis-Kit</i>	Agilent	210518
<i>Ribo m7G, Cap Analog</i>	PROMEGA	<i>P1712</i>
<i>RiboMAX™ Large Scale RNA Production System</i>	PROMEGA	P1300
<i>RNA Ladder RiboRuler High Range</i>	<i>Fisher Scientific</i>	<i>10785071</i>
Rotiload, 4 x konz, reduzierend	Roth	K929.1
SDS	Roth	CN30.2
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich	S6501
TEMED	Roth	236/3
Triton X-100	Fluka	93420
TRIZMA Base	Sigma-Aldrich	93352
TRIS-HCl	Roth	9090.3
Tween 20	Sigma-Aldrich	274348

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich auf meinem Weg begleitet und so jeder auf seine Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herr Prof. em. Dr. Wolfgang Clauss danke ich herzlichst für die bereitwillige Übernahme meiner Betreuung und Prüfung, auch über den Eintritt in seinen wohlverdienten Ruhestand hinaus.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei meinen weiteren Prüfern Frau Prof. Dr. Martina Trenczek, Herr Prof. Dr. Martin Diener und Herr Prof. Dr. Reinhard Lakes-Harlan bedanken.

Meinen ganz besonderen Dank widme ich Dr. Martin Fronius. Ihm danke ich nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch für die freundliche, kompetente und professionelle Betreuung - selbst über eine Distanz von 18.569,53 km Luftlinie hinweg. Auch danke ich ihm dafür, dass er mir stets mit wegweisenden Ratschlägen zur Seite stand, gleichzeitig jedoch die Freiheit zur Entwicklung und Durchführung selbstständiger Ideen gab und mir auf diese Weise den Weg zu eigenständigem wissenschaftlichen Arbeiten wies und ebnete. Besonders dankbar anerkennen möchte ich auch das in mich gesetzte Vertrauen, sowie die Gewährung jeder erdenklichen Art von Unterstützung - sei es beruflicher oder privater Natur. Nicht zuletzt die privaten Konversationen ließen ihn zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter für mich werden.

Mein ausdrücklicher Dank gilt auch Dr. Mike Althaus, der mit seiner Erfahrung und seinen kreativen Ideen, aber auch seiner konstruktiven Kritik eine ungemein sachkundige und wertvolle Bereicherung für dieses Forschungsprojekt darstellte. Für seine freundliche, uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft, mir sein umfassendes Wissen - insbesondere im molekularbiologischen Bereich - zu vermitteln, gebührt ihm mein ganz besonderer Dank. Ebenso danke ich ihm herzlichst für das stets humorvolle und freundschaftliche Arbeitsklima, das Korrekturlesen dieser Arbeit, sowie seine stetige und uneingeschränkte Unterstützung.

Ein besonders herzliches Dankeschön möchte ich auch an Frau Ursula Eichelmann richten. Nicht nur für ihre unschätzbare Hilfe bei allen organisatorischen Angelegenheiten und das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit. Auch für ihr stets offenes Ohr, ihre warmherzigen Ratschläge und aufmunternden Worte, sowie ihre Anteilnahme an allen kleinen und großen Sorgen sei ihr aufs Herzlichste gedankt.

Herrn Pawel Szczesniak möchte ich - ebenso wie Dr. Mike Althaus - ein herzliches Dankeschön für die Erstellung der Homologie-Modelle aussprechen, womit sie einen ungemein wertvollen Beitrag zu diesem Forschungsprojekt lieferten.

Für ihren Einfallsreichtum und die vielfältigen Ideen und Anregungen zur Entwicklung der Messkammer danke ich meinem Bruder Kolja Küpper, sowie meinem Vater Heinz Küpper. Ihm möchte ich zusätzlich für seine Hilfe bei Erstellung der Blockschaltbilder danken.

Für das akkurate und gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich zudem Dr. Sarah Kessler, Constanze Vitzthum und Nikolaus Dittrich.

Für die Bereitstellung des HA-getaggtten α ENaC danke ich Dr. Diego Alvarez de la Rosa von der *University of la Laguna*, Department of Physiology, Spain.

Herrn Gerd Magdowski aus dem *Institut für Anatomie und Zellbiologie* möchte ich für die ausgezeichnete und akribische Anfertigung der Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen danken.

Herrn Siegfried Kristek danke ich für die zügige Anfertigung der Messkammer und den Anschluss des Perfusionssystems.

Mein besonderer Dank richtet sich auch an meine Kollegen Nikolaus Dittrich, Katrin Richter, Anja Schnecko und Constanze Vitzthum sowie allen weiteren Mitarbeiter des Instituts für die durchweg harmonische und freundschaftliche Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Meinen Geschwistern, Eltern und Großeltern danke ich für ihr Verständnis, ihre aufbauenden Worte und den moralischen Beistand.

Meiner Schwiegermutter Gülcihan Knöpp möchte ich herzlichst für ihre tatkräftige Hilfe bei allen alltäglichen Dingen danken und dass sie stets zur Stelle war, wenn „*Not am Mann war*“. Mit ihrem warmherzigen und selbstlosen Wesen hat sie in hohem Maße zu dieser Arbeit beigetragen.

Zu guter Letzt möchte ich mich inständig bei Ibo, Neşe Marie und Yascha bedanken:

Dafür, dass ihr immer für mich da wart, an mich geglaubt und bedingungslos unterstützt habt. Auch danke ich euch dafür, dass ihr mich zum Lachen gebracht habt, wenn mir eigentlich nicht danach zumute war, sowie sämtliche Launen - von Euphorie bis Hysterie (auch im stündlichen Wechsel) - klaglos ertragen und lächelnd geduldet habt. Ihr wart immer der sprichwörtliche Fels in der Brandung, auf den ich mich blind verlassen konnte. Ohne euch wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen. Ich danke euch von ganzem Herzen!

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum

Unterschrift