

Institut für Tierphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Prof. Dr. W. Clauß

**Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC) durch
cAMP, Vasotocin und Glibenclamid**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
(Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften)
der Justus Liebig Universität Gießen

vorgelegt von
Martin Holler

Gießen 2001

Dekan	Prof. Dr. J. Janek
1. Gutachter	Prof. Dr. W. Clauß
2. Gutachter	Prof. Dr. M. Diener

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2001

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1 <i>Xenopus laevis</i> , der südafrikanische Krallenfrosch.....	4
2.2 Die Oocyten von <i>Xenopus laevis</i>	5
2.3 Oocyten als Expressionssystem für exogene Membranproteine.....	6
2.4 Haltung von <i>Xenopus laevis</i>	7
2.5 Gewinnung der Oocyten.....	7
2.6 Vereinzelung und Kultur der Oocyten.....	8
2.7 Mikroinjektion der cRNA in Oocyten.....	10
2.8 Lösungen.....	11
2.9 In vitro Transkription der cDNA.....	12
2.10 Elektrophysiologische Messungen mit der Voltage-Clamp- Technik.....	13
2.11 Messstand.....	14
2.12 Herstellung der Mikroelektroden.....	15
2.13 Auswertung der Messdaten.....	15
2.14 Statistik.....	16
3. Ergebnisse	17
3.1 Dosisabhängige Inhibierung des exogenen Na ⁺ Stroms durch Amilorid.....	17
3.2 cAMP stimuliert den gp $\alpha\beta\gamma$ -ENaC vermittelten Natriumstrom.....	20
3.3 Der Natriumstrom xENaC-exprimierender Oocyten wurde durch cAMP signifikant schwächer aktiviert als derjenige von gp $\alpha\beta\gamma$ - ENaC exprimierenden Oocyten.....	22
3.4 Arginin-Vasotocin (AVT) kann den Amilorid-sensitiven Na ⁺ Strom der ENaC-Chimäre erhöhen.....	24
3.5 Glibenclamid aktiviert unabhängig von cAMP den Natriumstrom gp $\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimierender Oocyten.....	26
3.6 Unter gleichzeitiger Amiloridapplikation kann Glibenclamid nicht den Strom gp $\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimierender Oocyten stimulieren.....	29

3.7 Glibenclamid hat keinen Effekt auf die Leitfähigkeiten nativer Oocyten.....	30
3.8 Der Gesamtstrom $r\alpha x\beta\gamma$ -ENaC exprimierender Oocyten wird nicht durch Glibenclamid gesteigert.....	31
3.9 Swap-Mutationen in der ENaC- α -Untereinheit können Hinweise auf den Angriffspunkt von Glibenclamid liefern.....	33
3.9.1 Die Chimäre $gp\alpha-r / x\beta\gamma$ ENaC wird durch Glibenclamid stimuliert.....	33
3.9.2 Glibenclamid erhöht den $r-gp\alpha-r / x\beta\gamma$ ENaC vermittelten Natriumstrom.....	34
3.9.3 $r-gp\alpha / x\beta\gamma$ ENaC reagiert sensitiv auf Glibenclamid.....	34
3.9.4 $r\alpha-gp / x\beta\gamma$ ENaC wird durch Glibenclamid stimuliert.....	35
3.9.5 Glibenclamid aktiviert den $gp\alpha-r\alpha-gp / x\beta\gamma$ ENaC vermittelten Natriumstrom.....	36
3.9.6 $gp-r\alpha / x\beta\gamma$ ENaC wird positiv durch Glibenclamid beeinflusst.....	36
4. Diskussion	39
4.1 Struktur und Funktion biologischer Membranen.....	39
4.2 Bau und Funktion von Epithelien.....	41
4.3 Epithelialer Natriumkanal (ENaC).....	42
4.4 Dosisabhängige Inhibierung des Na^+ -Stroms $gp\alpha x\beta\gamma$ -ENaC exprimierender Oocyten durch Amilorid.....	47
4.5 cAMP aktiviert den $gp\alpha x\beta\gamma$ -ENaC vermittelten Na^+ -Strom in <i>Xenopus</i> Oocyten.....	50
4.6 Arginin-Vasotocin (AVT) kann als primärer messenger für die cAMP.Wirkung auf den $gp\alpha x\beta\gamma$ -ENaC vermittelten Na^+ -Strom fungieren.....	52
4.7 Über welche Mechanismen könnte Glibenclamid die ENaC-Chimäre aktivieren.....	57
5. Zusammenfassung	66
Summary.....	68

6. Literaturverzeichnis	70
7. Anhang	100
7.1 Abkürzungen.....	100
7.2 Bezugsquelle der eingesetzten Geräte.....	102
7.3 Verwendete Chemikalien.....	103
Danksagung.....	104
Versicherung.....	105

1. Einleitung

Die elektrogene Natriumabsorption dichter Epithelien, wie dem distalen Nierentubulus (Shareghi et al., 1978), dem Sammelrohr der Niere (Frindt et al., 1990), den Atemwegen (Boucher et al., 1983; Knowles et al., 1984) und dem Colon (Will et al., 1985), wird durch Na^+ -Kanäle und die Na^+/K^+ -ATPase vermittelt. Entsprechend seines elektrochemischen Gradienten diffundiert Na^+ auf der apikalen Seite durch die epithelialen Na^+ -Kanäle (ENaCs) in die Zelle und wird auf der basolateralen Seite durch die Na^+/K^+ ATPase wieder entfernt. Dies gewährleistet die intrazelluläre Homöostase ebenso wie ein konstantes extrazelluläres Flüssigkeitsvolumen. Typische Merkmale der epithelialen Na^+ -Kanäle sind ihre spezifische Hemmbarkeit durch Amilorid sowie die hohe Selektivität für Natriumionen gegenüber Kaliumionen (Garty und Benos, 1988).

Der epitheliale Natriumkanal besteht aus homologen Untereinheiten, die mit α , β und γ bezeichnet werden. Nach dem aktuellen Modell von Firsov (1998) setzt sich der ENaC als Heterotetramer aus 2α - und je einer β - und γ - Untereinheit zusammen. Bereits 1993 wurde der ENaC aus dem Rattencolon kloniert (Canessa et al., Lingueglia et al.). Es folgte die Isolierung des Na^+ -Kanals oder seiner Untereinheiten aus der A6-Zelllinie von *Xenopus* (Puoti et al., 1995), der menschlichen Lunge (MacDonald, 1995), der Rinderniere (Fuller et al., 1995), dem Huhn (Goldstein et al., 1997) sowie der Maus (Dagenais et al., 1997).

Inzwischen sind mehrere Faktoren identifiziert worden, die die Anzahl der ENaCs (N) oder ihre Öffnungswahrscheinlichkeit (P_o) beeinflussen können. So stellen die intra- und extrazellulären Konzentrationen von Na^+ und Ca^{2+} , sowie der pH-Wert entscheidende Regulationsmechanismen dieses Natriumkanals dar (Garty und Palmer, 1997). Bei Wirbeltieren wird der ENaC zusätzlich durch verschiedene Hormone aktiviert. Das Mineralcorticoid Aldosteron steigert den transzellulären Na^+ -Transport über eine erhöhte Genexpression (Clauss et al., 1987; Horisberger und Rossier, 1992; Rossier und Palmer 1992; Verrey et al., 1995) während das Peptidhormon Arginin-Vasopressin (AVP = ADH) nach Bindung an seinen membranständigen V_2 -Rezeptor via G-Protein die Adenylatcyclase stimuliert. Das

darauflin gebildete cAMP fñhrt die Signalkaskade ùber die Proteinkinase A (PKA) fort (Li et al., 1982; Helman et al., 1983; Krattenmacher et al., 1988).

Als Liebold et al. (1996) Gesamt-RNA aus dem Colon von Meerschweinchen isolierten, die Na⁺-arm ernährt worden waren, und die entsprechende Poly A⁺ mRNA in *Xenopus laevis* Oocyten injizierte, wurden Amilorid-sensitive Natriumkanäle exprimiert. War es bislang nicht möglich, klonierte ENaCs in *Xenopus* Oocyten durch cAMP zu aktivieren, ließ sich hingegen der Kanal aus dem Meerschweinchendarm signifikant durch diesen second messenger stimulieren. Um auszuschließen, dass dieses unerwartete Ergebnis auf anderen Proteinen als dem ENaC basieren könnte, wurde damit begonnen, den ENaC aus dem Meerschweinchencolon (gp) zu klonieren. Da die alleinige Expression der α -Untereinheit in Oocyten nur zu sehr geringen Amilorid-sensitiven Na⁺-Strömen führte, wurde die α -Untereinheit des gp-ENaC mit der β - und γ - Untereinheit des Ratten-ENaC (rat) in *Xenopus* Oocyten coexprimiert (Schnizler et al., 2000). Die ENaC-Untereinheiten verschiedener Spezies lassen sich zu funktionellen Membrankanälen kombinieren. Während der Ratten-ENaC nur bei Transfektion von MDCK-Zellen und 3T3-Fibroblasten zu cAMP-aktivierbaren Na⁺-Strömen führte (Stutts et al., 1995), nicht aber in *Xenopus* Oocyten, ließ sich der gp α /r $\beta\gamma$ -ENaC-generierte Natriumstrom in Oocyten durch cAMP um den Faktor 3 (Schnizler et al., 2000) stimulieren. Die Applikation eines PKA-Inhibitors resultierte in einer Verringerung des Amilorid-sensitiven Stroms. Dies bestätigte die Involvierung der PKA am cAMP-induzierten Stromanstieg des gp α /r $\beta\gamma$ -ENaCs.

Auf der Suche nach weiteren Regulationsmechanismen des ENaC fanden Chraibi und Mitarbeiter (1999), dass Glibenclamid den ENaC des Frosches (xENaC), nicht aber den der Ratte bei Expression in *Xenopus* Oocyten aktivieren kann. Glibenclamid, welches in der Medizin zur Therapie des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt wird, ist auch ein Inhibitor des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR) und des CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Die Wirkungsweise dieser Substanz auf den in Oocyten exprimierten ENaC ist bislang ungeklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, folgende Fragen zu kären:

- Zeigt eine Kanalchimäre aus der α -Untereinheit des Meerschweinchen-ENaC ($gp\alpha$) und der *Xenopus* β - und γ -Untereinheit ($x\beta\gamma$) bei Expression in *Xenopus laevis* Oocyten ein pharmakologisches Profil, wie es für andere klonierte ENaCs typisch ist ?
- Lässt sich der $gp\alpha/x\beta\gamma$ -ENaC in *Xenopus* Oocyten durch membrangängiges cAMP aktivieren?
- Kann Arginin-Vasotocin (AVT) den Amilorid-sensitiven Na^+ -Strom des Hybridkanals erhöhen und einen möglichen cAMP-Effekt erklären?
- Ist Glibenclamid in der Lage, den Natriumstrom $gp\alpha/x\beta\gamma$ -ENaC-exprimierender Oocyten zu stimulieren?
- Falls cAMP und Glibenclamid beide einen positiven Einfluss auf den $gp\alpha/x\beta\gamma$ -ENaC ausüben sollten, sind diese Effekte unabhängig voneinander ?
- Vorausgesetzt, Glibenclamid stimuliert den Na^+ -Strom des untersuchten Kanals, lassen sich Hinweise auf den möglichen Angriffspunkt von Glibenclamid finden?

2. Material und Methoden

2.1 *Xenopus laevis* (Daudin, 1802), der südafrikanische Krallenfrosch

Die Klasse der Amphibien wird in 3 Taxa unterteilt:

1. Ordnung: Urodela (Caudata = Schwanzlurche)
2. Ordnung: Gymnophiona (Blindwühlen)
3. Ordnung: Anura (Ecaudata = Froschlurche)

Innerhalb der Anura zählt *Xenopus laevis* zur Unterordnung Aglossa (zungenlose Formen), der Familie Pipidae und der Unterfamilie Xenopinae (Storch et al., 1994). Das Verbreitungsgebiet rezenter Vertreter der Gattung *Xenopus* ist auf Afrika beschränkt.

Die Krallenfrösche sind urtümliche, strikt aquatische Froschlurche. Als Anpassung an das Wasserleben besitzt *Xenopus* seitlich abstehende Extremitäten, die nicht unter den Körper verlagert werden können, kleine Augen, deren Sehfeld nach oben gerichtet ist, sowie „das gut entwickelte Seitenlinienorgan, das bei anderen Anuren nach der Metamorphose zurückgebildet wird“ (Storch et al., 1993). Die Hinterextremitäten sind kräftig entwickelt und besitzen, neben den namensgebenden Krallen an den drei inneren Phalangen, große Schwimmhäute. Diese werden für den Vorschub beim Schwimmen eingesetzt. Die Vorderextremitäten hingegen sind relativ klein und werden tastend nach vorne gehalten. Sie dienen dem Beutefang, der Steuerung beim Schwimmen und den Männchen bei der Paarung zum Klammern der Weibchen (Hilken et al., 1997). Die Weibchen sind mit einer Kopf-Steiß-Länge von 10-13 cm deutlich größer als die Männchen.

In der Natur haben Krallenfrösche ein breites Nahrungsspektrum. Ihre Larven (Kaulquappen) ernähren sich als Filtrierer von pflanzlichem und tierischem Plankton. Die adulten Tiere fressen Crustaceen, Insekten, wasserlebende Würmer, Fische und andere Amphibien (Wager, 1965). Zusätzlich können auch Aas (Herder-Lexikon der Biologie, 1994) oder eigene Larven als Nahrungsquelle dienen (Brown, 1970; Heusser, 1993). Dabei nehmen die zungenlosen Krallenfrösche ihre Beute durch „Saugschnappen“ (Grimm, 1952) auf.

2.2 Die Oocyten von *Xenopus laevis*

Wurde früher der Krallenfrosch *in toto* primär zum Studium entwicklungsphysiologischer Prozesse eingesetzt, werden heute hingegen verstärkt seine Eizellen als Forschungsobjekt verwendet. Die Oocyte wird von einer Membran umgeben, die durch Mikrovilli eine vergrößerte Oberfläche besitzt. Diese Plasmamembran wird von einer Vitellinschicht umschlossen, welche als azelluläre Hülle die Form der Oocyte bestimmt. Umgeben wird dieses System von zahlreichen Follikelzellen, die die Versorgung der Oocyte mit Nährstoffen über gap junctions gewährleisten. Die Follikelzellen sind zusätzlich für die Reifung der Oocyte zum Ei verantwortlich, indem sie Progesteron freisetzen. Durch die bindegewebige Theka, in der sich auch Blutkapillaren und Nervenfasern befinden, werden die Oocyten zu Ovariallappen zusammengefasst.

Die experimentell verwendeten Oocyten sind in der Prophase der 1. Meiotischen Teilung arretiert. Während dieses Entwicklungsabschnitts durchlaufen die Zellen eine Differenzierungsphase, die in sechs Stadien untergliedert wird (Dumont, 1972). Wesentlich für die Unterscheidung der verschiedenen Stadien sind vor allem die unterschiedliche Größe und Pigmentierung der Oocyten. Oocyten der Stadien V und VI haben einen Durchmesser von 1-1,3 mm. Bei ihnen können animale und vegetative Hemisphäre farblich gut unterschieden werden: während die vegetative Hälfte aufgrund kristallin gepackter Dotterproteine beige gefärbt ist, führt eine erhöhte Konzentration von Melanin enthaltenden Pigmentgranula zum dunkelbraunen Erscheinungsbild der animalen Hemisphäre. Die dunkle Pigmentierung dient beim befruchteten Ei als Schutz vor Strahlungsschäden (Duellman und Trueb, 1994) und „Fressfeinden, die von oben auf den dunklen Untergrund sehend, nach Beute suchen“ (Hilken et al., S. 72, 1997). Weiterhin unterscheiden sich die beiden Hälften dadurch, dass die Beweglichkeit der Membranlipide in der vegetativen Hemisphäre höher (Dascal, 1987) und der mRNA- ebenso wie der Dotteranteil am vegetativen Pol größer ist. Der Zellkern befindet sich unter dem animalen Pol. Bei Oocyten des Stadiums VI werden die beiden Hemisphären durch einen äquatorialen Pigmentring voneinander getrennt. Während der Reifung ändern sich die biophysikalischen Eigenschaften der Zellmembran grundlegend. So löst die Oocyte des Stadiums VI ihre gap junctions und Desmosomen zum Follikelepithel und „zeigt verminderte Aktivität membranärer Transportsysteme“ (Hilken et al. S. 58, 1997).

2.3 Oocyten als Expressionssystem für exogene Membranproteine

Für die Verwendung von *Xenopus laevis*-Oocyten als Expressionssystem sprechen mehrere Aspekte: weibliche Krallenfrösche besitzen das gesamte Jahr über eine Vielzahl aller Entwicklungsstadien, die leicht zu gewinnen sind. Das Tier braucht zur Entnahme der Oocyten nicht getötet zu werden und ist in seiner Pflege relativ anspruchslos. Für die Arbeit mit diesen Zellen wird weder teures Nährmedium benötigt noch eine sterile Zellkultur. Aufgrund ihrer enormen Größe lassen sich die Oocyten der Stadien V und VI leicht manipulieren. Bedingt durch die große Anzahl an Ribosomen weisen die Zellen eine hohe translationale Kapazität auf. Die Rate der Proteinbiosynthese ist schneller als in zellfreien Systemen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass es in den omnipotenten *Xenopus* Oocyten (im Gegensatz zu prokaryotischen Expressionssystemen oder in vitro – Translationssystemen) zu einer korrekten Prozessierung der fremden genetischen Information kommt. So erfolgt die Abspaltung von Signalsequenzen ebenso wie die posttranslationale Modifikation (z.B. Phosphorylierung, Acetylierung und Glykosylierung) eines Proteins korrekt. Auch die entstandenen Produkte lokalisieren in der Zelle an der richtigen Stelle. So erreichen integrale Proteine die Oocytenmembran und „agieren dort funktionstüchtig, wie unter den ursprünglichen physiologischen Bedingungen innerhalb ihrer Donorzelle“ (Hilken et al., S.53, 1997). Als Nachteil dieses Expressionssystems sind variierende Qualität der Oocyten (Stühmer, W., 1998), sowie die kurze Expressionsdauer zu nennen (Sigel, 1990).

Seit der erstmaligen Expression eines Fremdproteins (Gurdon et al., 1971) haben sich die Oocyten als Expressionsmodell in der Forschung etabliert. Dazu erfolgt entweder eine Mikroinjektion der mRNA in das Cytoplasma oder die DNA wird in den Zellkern eingebracht. Die Translation der fremden mRNA wird nicht durch endogene mRNA behindert, da diese durch Proteinassoziation zu 95% blockiert vorliegt („masked RNA“). Weiterhin ist die Menge der injizierten mRNA so groß, dass sie die Oocyten-eigene mRNA kompetitiv hemmt (Taylor et al., 1985). Wurden zunächst Interferon oder virale Proteine in Oocyten exprimiert, führten Miledi und Mitarbeiter (1982) auch erfolgreich die Expression von Ionenkanälen und Rezeptoren in diesen Zellen durch.

Durch das vorhandene Expressionssystem ist es möglich, Struktur und Funktion von Ionenkanälen und Rezeptoren zu untersuchen, Eigenschaften mutierter

Kanäle aufzudecken, Signalkaskaden verschiedener second messenger - Systeme zu charakterisieren und auch klonierte Kanäle zu erforschen (Axon Guide, 1993).

2.4 Haltung von *Xenopus laevis*

Dadurch, dass *Xenopus laevis* als eurytherme Spezies in der Lage ist, große Temperaturunterschiede zu tolerieren (Hilken et al., 1997) und in der Natur sowohl in Gewässern mit niedrigem pH-Wert, als auch in solchen mit pH 9 lebt (Wu und Gerhart, 1991), machen den Krallenfrosch ebenso zu einem geeigneten Labortier wie die Tatsache, dass er kein territoriales Verhalten zeigt (Haubrich, 1961) und ein breites Nahrungsspektrum besitzt.

Die Tiere wurden direkt aus Südafrika (African Xenopus Facility, Knysna) importiert und in 250l Becken gehalten. Pro Becken befanden sich bis zu 25 Frösche. Das Leitungswasser wurde kontinuierlich durch einen Sprudelstein mit Sauerstoff angereichert. Die durchschnittliche Wassertemperatur betrug 16°C. Als Unterschlupf dienten den Tieren halbierte Tontöpfe. Die Fütterung erfolgte einmal wöchentlich mit kleingeschnittenem Rinderherz oder trockenem Forellenfutter („*Xenopus*-Pellets“). Am darauffolgenden Tag wurden die Wasserbecken gereinigt. Im Labor werden Krallenfrösche durchschnittlich 15 Jahre alt (Hilken et al., 1997).

Für die Haltung der Tiere und Entnahme der Oocyten lag eine Genehmigung des RP Gießen vor (17a-19c20/15 (1) Gi 15/7 – 1/92).

2.5 Gewinnung der Oocyten

Vor der Oocytenentnahme wurde das adulte Weibchen für ca. 40 min. in einem Eis-Wassergemisch hypothermal anästhesiert. Durch Berühren der Kehlgregion ließ sich das Aussetzen des respiratorischen Schluckreflexes prüfen. Der betäubte Frosch wurde in eine Operationsschale auf den Rücken gelegt und – bis auf den caudalen Abdominalbereich - mit Eis bedeckt. Mit einer sterilen Schere wurde die Bauchdecke durch einen 1 cm langen Schnitt geöffnet. Anschließend konnte der

Ovarlappen mit abgewinkelten Pinzetten ergriffen und vorsichtig durch die operative Öffnung nach außen gezogen werden. Die benötigte Menge des Ovars wurde abgeschnitten und sofort in ein Becherglas mit Kulturringer (KulORi, **Tab. 1**) überführt. Durch zwei Stiche mit chirurgischen Nadeln (Federöhr PB7, Vömel, Kronberg) und steriler Nähseide (gezwirnt 3/0 oder geflochten 4/0, Vömel, Kronberg) erfolgte das Vernähen der Muskulatur und Bauchhaut. Nach dem Wundverschluss wurde das Tier unter fließendem Wasser wieder aufgeweckt und für die nächsten beiden Tage in einem Einzelbecken gehalten. Die Fäden lösten sich von selbst nach einigen Wochen auf. Eine Infektion der Operationsnaht trat nie auf. Ursache hierfür ist sicher auch die Absonderung von antimikrobiellen Peptiden (Magainine) durch die Froschhaut (Zasloff 1987, Goldin 1992).

2.6 Vereinzelung und Kultur der Oocyten

Innerhalb des Ovars liegen die Oocyten in einem Zellverband aus Bindegewebe mit Blutgefäßen, kontraktile Elementen, Nervenfasern und Follikelzellen vor (**Abb. 1**) (Dumont und Brummett, 1978).

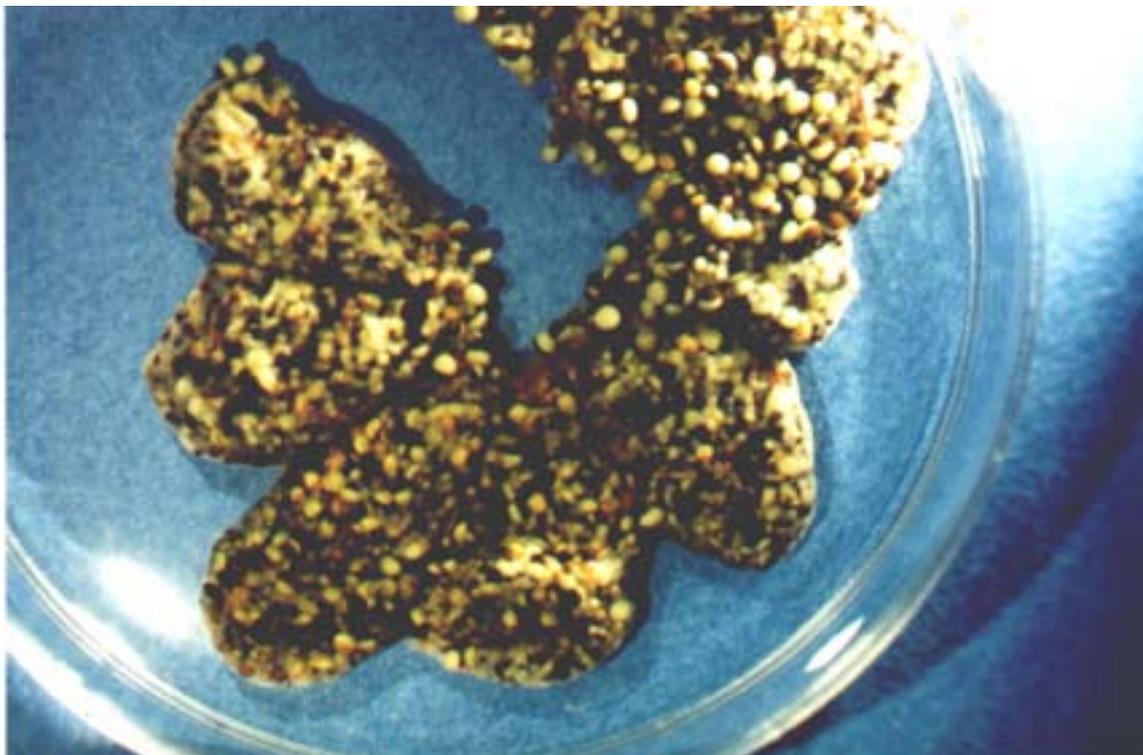


Abb. 1: Ovariallappen von *Xenopus laevis*

Zur Vereinzelung der Oocyten aus diesem Gewebeverband wurden die Ovarlappen vorsichtig mit Pinzetten in kleine Stücke zerteilt. Durch 90 minütige Inkubation in einer collagenasehaltigen Lösung auf dem Schüttler erfolgte die Entfernung der Bindegewebsreste. Die von *Clostridium histolyticum* produzierte Collagenase besitzt proteolytische Aktivität (0,87-1,0 PZU/mg) und wurde in einer Konzentration von 1,5 mg/ml KulORi eingesetzt. Anschließend wurden die Oocyten bis zur Klärung der Lösung mit KulORi gewaschen, um Collagenasereste zu entfernen, die sonst Membranproteine enzymatisch schädigen könnten. Verbliebene Follikelzellen konnten durch 10 minütige Inkubation in Ca^{2+} -freiem KulORi (**Tab. 1**) von den Oocyten getrennt werden. Aufgrund fehlender Ca^{2+} Ionen kommt es zur Entkopplung der Desmosomen, tight junctions und gap junctions. Nach dreimaligem Waschen mit Kulturringer wurden die vereinzelt, defollikulierten Oocyten der Stadien V und VI mit Hilfe einer Pasteurpipette unter dem Binokular aussortiert (**Abb. 2**). Auswahlkriterium war hierbei eine homogene Pigmentierung und eine gleichmäßig runde Form der Zellen.



Abb. 2: *Xenopus* Oocyten des Stadiums VI nach der Collagenasebehandlung

Die Oocyten wurden nun bis zur Injektion der cRNA bei 14°C in KulORi aufbewahrt. Diese Ringerlösung enthielt Penicillin G und Streptomycin, um bakteriellen Befall zu verhindern. Pyruvat diente als Energiequelle.

2.7 Mikroinjektion der cRNA in Oocyten

Vor der Injektion wurde die Arbeitsfläche mit 70% -igem Ethanol gereinigt. Das Tragen von Handschuhen verhinderte eine Kontamination mit RNasen. Die nötigen Glaskapillaren wurden an einem vertikalen Puller gezogen und luftblasenfrei mit Mineralöl gefüllt. Nach der Montage auf die Injektionsnadel wurde der erforderliche Spitzendurchmesser der Kapillare durch Abbrechen mit einer feinen Pinzette erreicht. Die, zum Schutz vor Verdunstung, unter Öl befindliche cRNA wurde langsam in die Injektionskapillare aufgezogen. Das Injektionsvolumen lag je nach RNA-Konzentration zwischen 23 und 41 nl. Dadurch betrug die injizierte RNA-Menge pro Oocyte ca. 0,7 ng/ENaC-Untereinheit. Die Oocyten wurden für die Injektion in eine Oocytenleiter positioniert und für die anschließende Expression des fremden Membranproteins bei 14°C in NMDG-KulORi (**Tab. 1**) inkubiert. Da diese Lösung kein NaCl enthielt, wurden verstärkt die exogenen Natriumkanäle in die Oocytenmembran eingebaut. Die Voltage-Clamp-Messungen wurden 1-3 Tage nach der RNA-Injektion durchgeführt. Täglich wurden überalterte oder verletzte Oocyten entfernt und ein Lösungswechsel durchgeführt.

2.8 Lösungen

Tab. 1: Lösungen für die Präparation und Aufbewahrung der Oocyten

Substanz	KuIORi [mM]	Ca ²⁺ -freier KuIORi [mM]	NMDG-KuIORi [mM]
NaCl	90	90	10
KCl	1	1	1
NMDG			80
CaCl ₂	2		2
HEPES	5	5	5
Na ⁺ -Pyruvat	2,5		2,5
Penicillin G	0,06		0,06
Streptomycin	0,02		0,02
pH 7,4 mit:	1M NaOH	1M NaOH	HCl

Tab. 2: Superfusionslösungen

Substanz	Ori [mM]	Na ⁺ -freier Ori [mM]	cAMP-Ori [mM]
NaCl	90		90
KCl	1	1	1
TMA-Cl		90	
CaCl ₂	2	2	2
HEPES	5	5	5
cAMP			0,05
IBMX			1
pH 7,4 mit:	1M NaOH	1M KOH	1M NaOH

Bei Verwendung von DMSO im Versuch wurden Kontrollexperimente mit der gleichen Endkonzentration dieses Lösungsmittels durchgeführt, um einen Einfluss dieser Substanz auszuschließen.

2.9 In vitro Transkription der cDNA

Zur Gewinnung der ENaC-cRNA für die Mikroinjektion musste die, in einem Plasmid integrierte (**Tab. 3**), cDNA zunächst transkribiert werden. Dazu wurden 3 µg Plasmid-DNA eingesetzt und mit einem Restriktionsenzym (**Tab. 3**) linearisiert. Dieses wurde später durch Zugabe von Proteinase K zerstört. Eine zweimalige Phenol/Chloroform-Extraktion trennte anschließend unerwünschte Proteine ab. Die Reinigung wurde mit einer reinen Chloroform-Extraktion beendet. Nach Fällung der DNA mittels 3M Natriumacetat (0,1 Volumen) und 100%-igem Ethanol (2 Volumenanteile) bei -20°C wurde die DNA zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das Pellet wurde in 5µl RNase-freiem TE-Puffer aufgenommen. Die anschließende cRNA-Synthese und Capping-Reaktion erfolgte durch Verwendung des mCAPTM mRNA Capping KIT (Stratagene). Zur Transkription der guinea-pig-ENaC- α -Untereinheit wurde die T7-RNA-Polymerase (45 min. bei 37°C), für die Synthese der Ratten- und *Xenopus*-Untereinheiten die SP6-RNA-Polymerase eingesetzt. Die DNA konnte mit Hilfe der RNase-freien DNase I aus dem entstandenen DNA-RNA-Hybrid enzymatisch entfernt werden. Mit Hilfe einer Phenol/Chloroform-Extraktion ließen sich die RNA-Polymerase und die DNase abtrennen. Nach Ermittlung der cRNA-Konzentration wurde diese bei -80°C aufbewahrt.

Tab. 3: Restriktionsenzyme und RNA-Polymerasen für die cRNA-Synthese

ENaC-Untereinheit	rekombinantes Plasmid	Restriktionsenzym	RNA-Polymerase
guinea-pig α	PSPORT 1	Xba I	T7
rat α	PSD5	Bgl II	SP6
<i>Xenopus</i> α	pSDEasy	Afl III	SP6
<i>Xenopus</i> β	pSDEasy	Bgl II	SP6
<i>Xenopus</i> γ	PSDEasy	Afl III	SP6

Die cDNA, die den ENaC aus dem Rattencolon codiert (rENaC), sowie diejenige, welche die Information für den ENaC aus der A6-Nierenzelllinie von *Xenopus*

(xENaC) trägt, wurden freundlicherweise von B. Rossier (Lausanne) zur Verfügung gestellt. Die Swap-Mutanten, bei denen der C-und/oder N-Terminus zwischen der α -Untereinheit des Meerschweinchens ($gp\alpha$) und der Ratte ($r\alpha$) ausgetauscht sind, wurden von M. Schnizler (Giessen) konstruiert. Für die elektrophysiologischen Messungen wurde ein Gemisch aus den drei ENaC-Untereinheiten injiziert.

2.10 Elektrophysiologische Messungen mit der Voltage-Clamp-Technik

Das Membranpotential V_m resultiert aus der unterschiedlichen Konzentration von Ionen im Cytoplasma und im extrazellulärem Raum, sowie der selektiven Durchlässigkeit der Membran für die Ionenarten. Dieses elektrochemische Potenzial lässt sich berechnen aus der Differenz zwischen dem Potenzial des Zellinneren V_i und des extrazellulären Potenzialwertes V_a . Dabei dient V_a als Referenzwert und wird als Nullpunkt definiert.

Ursprünglich wurde die Spannungsklemme von Hodgkin, Huxley und Katz (1949, 1952) entwickelt, um elektrisch erregbare Zellmembranen zu erforschen. Dabei wurde das Membranpotential eines Tintenfischaxons künstlich auf einen konstanten Wert gehalten und der daraus resultierende Membranstrom gemessen. Das Messprinzip basiert auf einem Rückkopplungssystem: das Membranpotential V_m wird mit Hilfe einer Mikroelektrode gemessen und mit dem gewünschten Haltepotential V_c verglichen. Durch die Applikation eines Stromes I_m lassen sich Unterschiede zwischen gemessenem V_m und dem Sollwert V_c kompensieren. Dabei ist der, zur Konstanthaltung des Haltepotenzials notwendige, Strom genauso groß wie der Ionenstrom, der durch die Membran fließt.

Das Membranpotential der Oocyte wurde durch Einstechen der Potzialelektrode in die Zelle und der Badelektrode I (=Referenzelektrode) gemessen; über eine zweite Badelektrode war das Bad geerdet. Ein Differenzverstärker ermittelte aus den Daten der intra- und extrazellulären Elektrode V_m . Ein zweiter Differenzverstärker verglich nun das Membranpotential mit dem gewünschten Haltepotential, das in den vorliegenden Versuchen auf -60 mV geklemmt wurde. Dieses Steuersignal wurde vom Computer über einen AD/DA – Wandler vorgegeben (**Abb. 3**). Über einen Strom/Spannungswandler

wird der kompensatorische Strom I_m , mittels in die Zelle eingestochener Stromelektrode, appliziert. Dieser Klemmstrom wurde gefiltert und mit einem Amperemeter gemessen. Ein Zweikanalschreiber zeichnete die Strom- und Spannungswerte kontinuierlich auf. Der Oszillograph machte mögliche Störungen des Systems sichtbar.

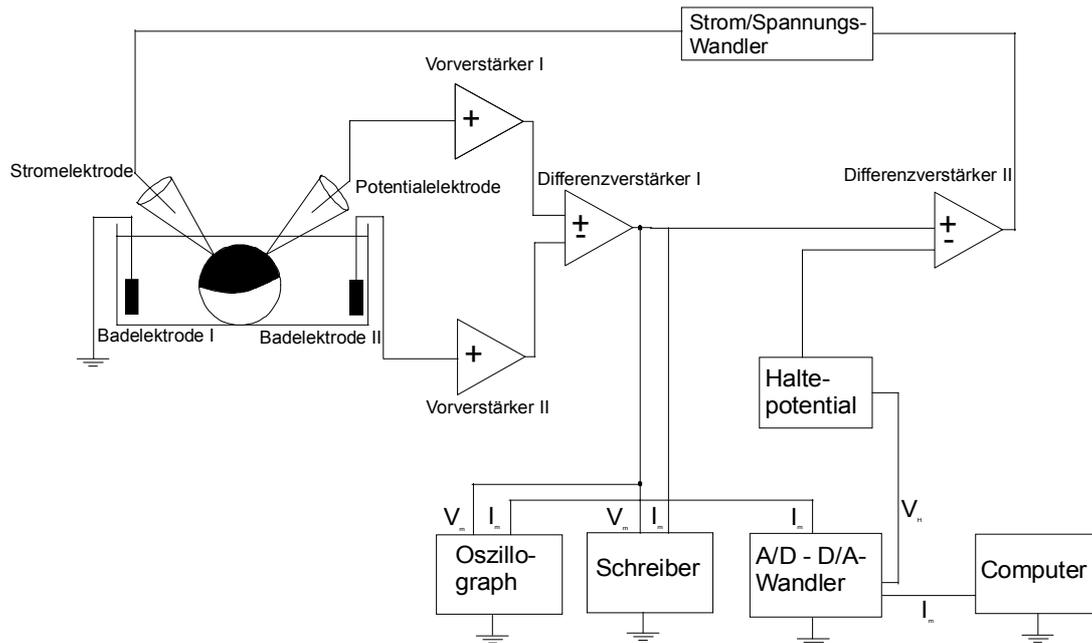


Abb. 3: Schaltplan der Voltage-Clamp

2.11 Messstand

Da die Messung von Strömen im nA-Bereich sehr empfindlich ist, befand sich die Messkammer auf einem schwingungsgedämpften Tisch, wodurch mechanische Störungen reduziert wurden. Um elektromagnetische Einstreuungen zu verhindern, wurde der Messplatz von einem Faradaykäfig umgeben. Zusätzlich wurden alle Geräte geerdet. Das Binokular und eine Kaltlichtlampe ermöglichten die Positionierung der Oocyte in der Mitte der Messkammer. Die beiden Elektroden konnten über Mikromanipulatoren an die Eizelle herangefahren werden. Die Lösungen befanden sich in Flaschen über der Messkammer und liefen durch Infusionsschläuche und Ventile zur Oocyte. Eine Vakuumpumpe

saugte kontinuierlich das Badmedium ab. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.12 Herstellung der Mikroelektroden

Eine Kapillare aus Borosilikat-Filamentglas (Außendurchmesser 0,7mm, Innendurchmesser 1,2mm) wurde in einen horizontalen Laserpuller eingespannt und durch Erhitzen in zwei Hälften ausgezogen, deren Öffnungsdurchmesser $< 1\mu\text{m}$ betrug. Kapillaren für Potenzialelektroden wurden luftblasenfrei mit 1M KCl, diejenigen für Stromelektroden mit 3M KCl gefüllt. Die Silberdrähte der Elektrodenhalter wurden durch angelegte Spannung in 0,1M HCl bis zur Hälfte ihrer Länge chloriert (Ag/AgCl-Elektroden). Die mit Elektrolytlösung gefüllten Glaskapillaren wurden nun über die chlorierten Silberdrähte geschoben, befestigt und mit ihrer Spitze in die Badlösung eingetaucht. Nach dem Abgleich der Elektroden-Offsets wurden kontrolliert, ob die Elektrodenwiderstände zwischen 1-5 $\text{M}\Omega$ lagen.

2.13 Auswertung der Messdaten

Für die Voltage-Clamp Messungen wurde die Oocytenmembran stets auf ein Haltepotenzial von -60 mV geklemmt. Die Ermittlung von Strom-Spannungsabhängigkeiten erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms (aus dem MPI für Biophysik, AG Schwarz, Frankfurt a.M.), wobei Rechteckspannungsimpulse für eine Dauer von 400 ms appliziert und das Potenzial in 10mV Schritten mit Pausen von 1s von -150 bis $+50\text{ mV}$ geklemmt wurde. Der Computer speicherte die gemittelten steady-state Ströme während der letzten 50 ms des Spannungspulses. Dadurch wurden nur die stationären Stromanteile, nicht aber die kapazitive Stromkomponente berücksichtigt. Das Auftragen dieser Stromwerte auf der Y-Achse gegen die Klemmspannung auf der X-Achse ergibt eine Strom-Spannungskurve. Der Schnittpunkt dieser IV-Kurve mit der Abszisse wird als Umkehrpotenzial bezeichnet; hier sind der Ionenein- und der Ionenausstrom gleich groß. Die Steigung der Kurve gibt nach dem Ohm'schen

Gesetz (**Gl. 1**) Auskunft über die Leitfähigkeit (G) der Membran. Die Leitfähigkeit steht in direktem Zusammenhang mit der Anzahl (N) und der Öffnungswahrscheinlichkeit (P_o) der Ionenkanäle.

$$R = \frac{U}{I} \Leftrightarrow I = \frac{U}{R} \quad ; \quad R = \frac{1}{G} \Rightarrow G = \frac{I}{U} \quad \text{(Gl. 1)}$$

2.14 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Anzahl der eingesetzten Tiere wurde mit „N“, die Zahl der durchgeführten Experimente mit „n“ gekennzeichnet. Mit Hilfe des t-Tests ließen sich signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Messreihen ermitteln. Als Signifikanzgrenze galt $p \leq 0,05$. Signifikant unterschiedliche Werte wurden mit einem Stern als solche kenntlich gemacht. Gemäß der Vorzeichenkonvention ist ein Strom positiver Ionen vom extrazellulären Milieu in die Zelle ein Einwärtsstrom und wird nach unten dargestellt. Entsprechend wird eine Kationenbewegung aus der Zelle heraus als Auswärtsstrom definiert und nach oben aufgetragen (Numberger und Dragulm, 1996).

3. Ergebnisse

Expression der $gp\alpha\beta\gamma$ -ENaC-Chimäre in *Xenopus* Oocyten

Da die Expression der ENaC α -Untereinheit aus dem Meerschweinchencolon ($gp\alpha$) in *Xenopus* Oocyten alleine nur zu sehr geringen Amilorid-sensitiven Natriumströmen führt (Schnizler et al., 2000), wurde $gp\alpha$ -cRNA mit der cRNA coexprimiert, die für die β - und γ -ENaC-Untereinheit von *Xenopus laevis* ($x\beta\gamma$) codiert. Dadurch entstehen funktionelle Natriumkanäle in der Oocytenmembran. Dass sich die ENaC-Untereinheiten aus verschiedenen Tierarten und Geweben in Oocyten frei miteinander kombinieren lassen, belegten MacDonald und seine Mitarbeiter 1995.

3.1 Dosisabhängige Inhibierung des exogenen Na^+ Stroms durch Amilorid

Amilorid inhibiert spezifisch und reversibel den ENaC (Garty et al., 1988). Um die halbmaximale Blockerkonzentration (k_i) dieses Diuretikums für den $gp\alpha x\beta\gamma$ -ENaC zu ermitteln, wurde Amilorid in zwei Versuchsreihen in steigenden Konzentrationen [0,1; 2,5; 10; 75; 1000 nM und 100 μ M (N = 5, n = 9) bzw. 1; 7,5; 25; 100 nM; 10 μ M und 100 μ M (N = 2, n = 9)] appliziert. Anschließend wurde die Wirkung der maximalen Blockerkonzentration 100 % gleichgesetzt (**Tab. 4**) und die entsprechende Inhibition des Amilorid-sensitiven Na^+ Stroms (I_{ami}) in % errechnet.

Tab. 4: Dosisabhängige Inhibierung des Natriumstroms $g_{\alpha\beta\gamma}$ -ENaC exprimierender Oocyten durch Amilorid

	Amiloridkonzentration					
	0,1 [nM]	1 [nM]	2,5 [nM]	7,5 [nM]	10 [μ M]	25 [μ M]
Inhibition von I_{ami} [%]	$3,4 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,3$	$10,6 \pm 1,2$	$10,7 \pm 1,5$	$14,8 \pm 2,2$	$22,6 \pm 2,9$

	Amiloridkonzentration				
	75 [nM]	100 [nM]	1 [μ M]	10 [μ M]	100 [μ M]
Inhibition von I_{ami} [%]	$53,9 \pm 2,3$	$43 \pm 2,6$	$73,7 \pm 1,7$	$92,5 \pm 0,6$	100

Wie in **Tab. 4** dargestellt, wurde der Amilorid-sensitive Na^+ -Strom durch Konzentrationen des Blockers bis 10 nM nur geringfügig gehemmt. Bei höheren Amiloridkonzentrationen nahm die Inhibition des I_{ami} stark zu, was in der **Abb. 4** als sigmoidale Kurve zu erkennen ist. Mit 10 μ M Amilorid erreichte die Hemmung des I_{ami} eine über 90 %ige Sättigung.

In **Abb. 4** wurde die Amiloridkonzentration gegen I_{ami} aufgetragen und mit Hilfe der Gleichung 2 (**Gl. 2**) eine Kurve angepasst. Der k_i -Wert von $130,2 \pm 21$ nM belegt, dass der exprimierte Hybridkanal für Amilorid hochaffin ist. In allen folgenden Experimenten wurde mit einer Amiloridkonzentration von 10 μ M gearbeitet, da hier der ENaC durch Amilorid praktisch vollständig blockiert wird.

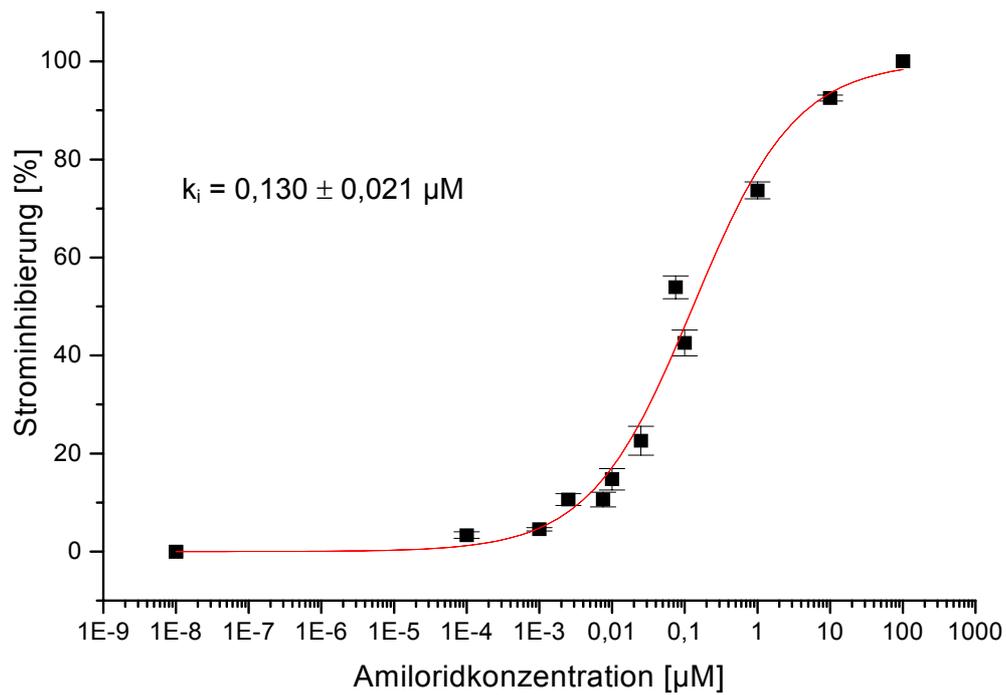


Abb. 4: Konzentrations-Wirkungskurve von Amilorid für gp α x β γ -ENaC exprimierende Oocyten (N = 7, n = 9).

$$y = A * \frac{(x^n)}{((x^n) + (B^n))} \quad (\text{Gl. 2})$$

(A = maximale Hemmung, B = k_i -Wert, n = Hill-Koeffizient)

Der ermittelte Hill-Koeffizient betrug im Mittel $0,6 \pm 0,06$. Dies bedeutet, dass 1 Amiloridmolekül an einen Na⁺-Kanal bindet und diesen dadurch hemmt.

3.2 cAMP stimuliert den $g\alpha\beta\gamma$ -ENaC vermittelten Natriumstrom

Das durch die Adenylatcyclase gebildete cAMP leitet als second messenger externe Informationen von Peptidhormonen in der Zelle weiter. Nach Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch cAMP erfolgt die Phosphorylierung spezifischer Effektorproteine. Für das Integument des Blutegels *Hirudo medicinalis* und die Krabbenkieme von *Eriocheir sinensis* konnte eine Erhöhung des Na^+ -Transportes durch cAMP (Weber et al, 1993, Riestenpatt et al., 1994) ebenso nachgewiesen werden, wie am Froschcolon (Krattenmacher et al., 1988). Auch das Meerschweinchencolon zeigt eine Steigerung des Amilorid-sensitiven Na^+ -Stroms nach cAMP-Applikation (unveröffentlichte Daten von G. Rechkemmer).

Um zu überprüfen, ob intrazelluläres cAMP einen regulatorischen Effekt auf den in *Xenopus* Oocyten exprimierten $g\alpha\beta\gamma$ -ENaC ausübt, wurden der Ringerlösung 50 μM membrangängiges cpt-cAMP und 1mM IBMX zugefügt. IBMX sollte die Phosphodiesterasen der Oocyte hemmen und somit eine konstante cAMP-Konzentration gewährleisten. Wenige Minuten nach cAMP-Applikation erhöhte sich der Amilorid-sensitive Natriumstrom signifikant um $532 \pm 88 \%$ (N = 5, n = 15) (**Abb. 5**).

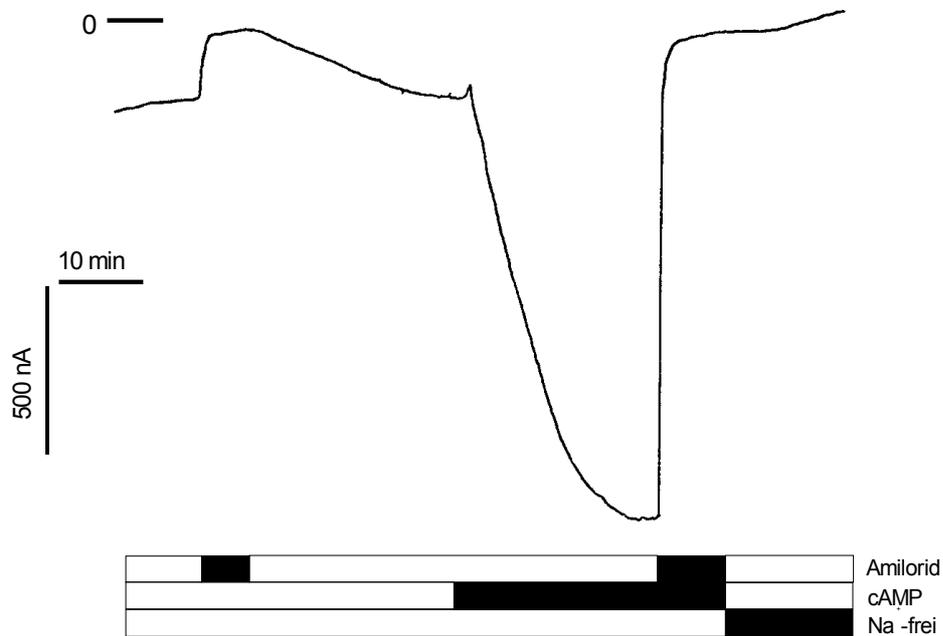


Abb. 5: Stimulation des Amilorid-sensitiven Na^+ Stroms einer $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC exprimierenden Oocyte durch intrazelluläres cAMP

Wie der **Tab. 5** zu entnehmen ist, aktivierte cpt-cAMP den Amilorid-sensitiven Natriumstrom um durchschnittlich 1046 ± 225 nA.

Tab. 5: Vergleich des Gesamtstroms (I_m) und des Amilorid-sensitiven Na^+ Stroms (I_{ami}) $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC exprimierender Oocyten vor und nach cAMP-Superfusion (N = 5, n = 15).

	vor cAMP		mit cAMP		Stimulation durch cAMP [%]	
	I_m [nA]	I_{ami} [nA]	I_m [nA]	I_{ami} [nA]	I_m	I_{ami}
$\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ ENaC	229 ± 30	183 ± 23	$1304 \pm 246^*$	$1230 \pm 241^*$	$445 \pm 71^*$	$532 \pm 88^*$

Die Differenzkurven in **Abb. 6** zeigen die Zunahme des Amilorid-sensitiven Na^+ Stroms $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma\text{-ENaC}$ exprimierender Oocyten vor und nach der cAMP-Applikation. Durch die Aktivierung mit cAMP nahm die IV-Kurve einen steileren Verlauf und das Umkehrpotenzial verschob sich von -10 mV auf $+20\text{ mV}$.

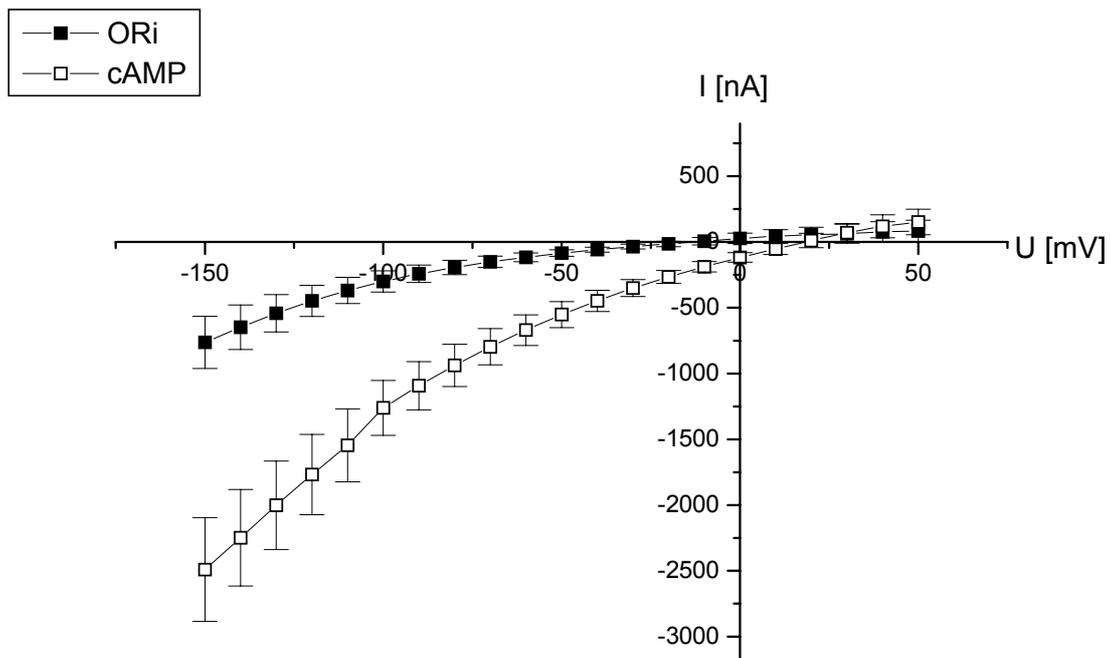


Abb. 6: Strom-Spannungskurven des Amilorid-sensitiven Natriumstroms. Die gemittelten Differenzkurven stellen den Amilorid-sensitiven Na^+ Strom $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma\text{-ENaC}$ exprimierender Oocyten vor und nach der Superfusion mit cAMP dar ($N = 2, n = 5$)

3.3 Der Natriumstrom xENaC -exprimierender Oocyten wurde durch cAMP signifikant schwächer aktiviert als derjenige von $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma\text{-ENaC}$ exprimierenden Oocyten

Kontrollmessungen an xENaC -exprimierenden Oocyten ergaben eine signifikant niedrigere Stimulation des Amilorid-hemmbareren Na^+ Stroms durch cAMP im

Vergleich zu $g\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimierenden Oocyten (**Abb. 7**). In diesen Experimenten erhöhte sich I_{ami} nach cAMP-Zugabe um 145 ± 53 nA (N = 3, n = 7).

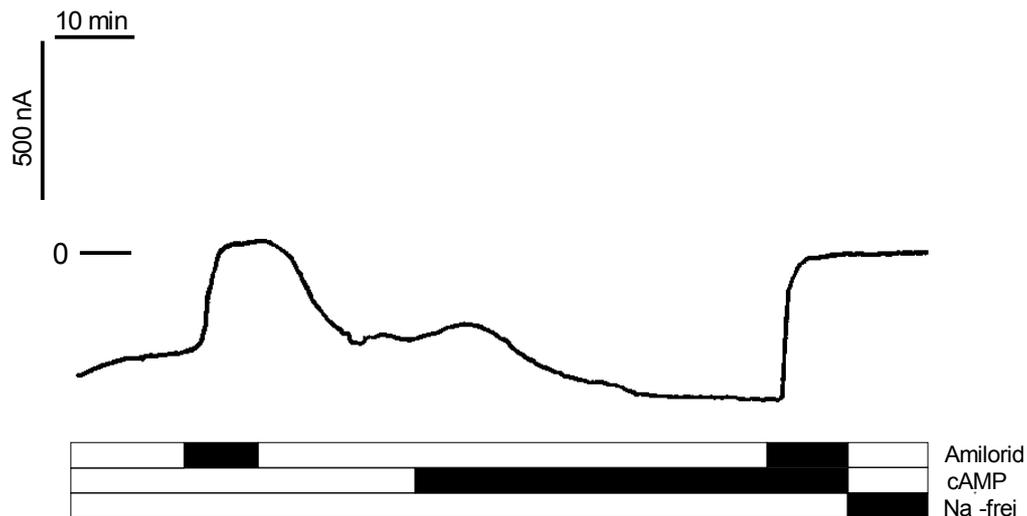


Abb. 7: Wirkung von 50 μ M cAMP auf den Klemmstrom einer xENaC exprimierenden Oocyte

In **Tab. 6** ist die durchschnittliche Steigerung des Gesamtstroms und des Amilorid-sensitiven Na^+ -Stroms durch cAMP dargestellt.

Tab. 6: Effekt von cAMP auf den absoluten Klemmstrom (I_m) und den Amilorid-sensitiven Na^+ Strom (I_{ami}) xENaC exprimierender Oocyten (N = 3, n = 7).

	vor cAMP		mit cAMP		Stimulation durch cAMP [%]	
	I_m [nA]	I_{ami} [nA]	I_m [nA]	I_{ami} [nA]	I_m	I_{ami}
$x\alpha\beta\gamma$ -ENaC	234 ± 30	190 ± 33	$387 \pm 75^*$	$335 \pm 67^*$	$63 \pm 24^*$	$79 \pm 25^*$

Die **Abb. 8** zeigt, dass sich die Stimulation des I_{ami} in xENaC und $gp\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimierenden Oocyten durch cAMP signifikant unterscheidet.

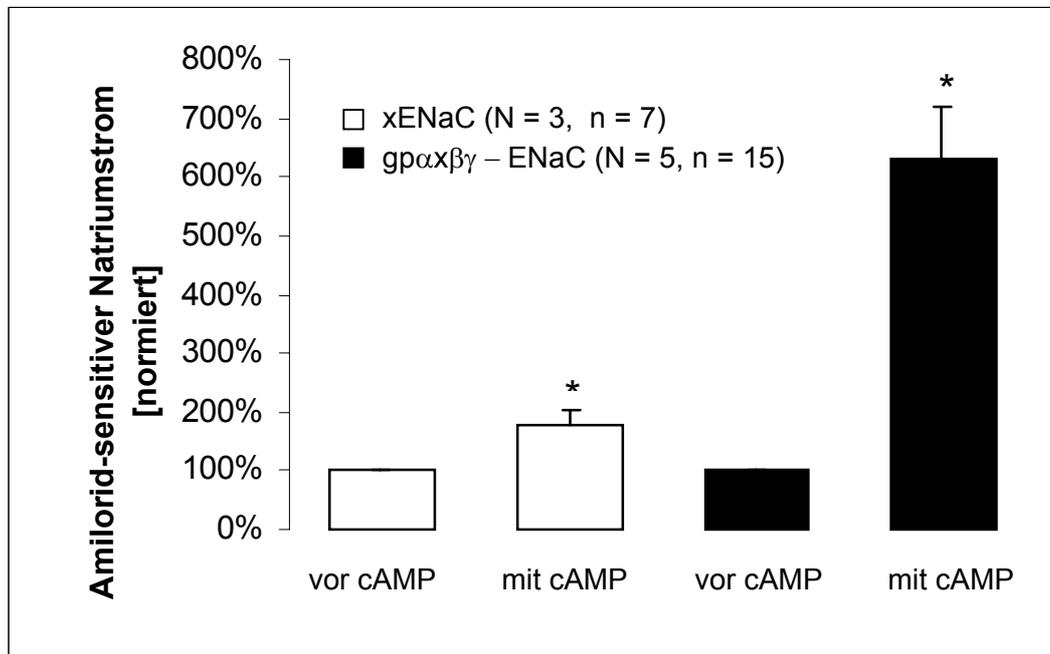


Abb. 8: Vergleich des cAMP-Effektes auf den Amilorid-sensitiven Strom xENaC- bzw. $gp\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimierender Oocyten

3.4 Arginin-Vasotocin (AVT) kann den Amilorid-sensitiven Na^+ Strom der ENaC-Chimäre erhöhen

Da keiner der bislang klonierten ENaCs bei Expression in *Xenopus* Oocyten eine vergleichbare Stimulierung durch cAMP zeigte (Awayda et al., 1996, Fuller et al., 1995) wie dies bei der $gp\alpha\beta\gamma$ -Chimäre der Fall war, stellte sich nun die Frage nach dem first messenger für die cAMP-Kaskade. Es ist bekannt, dass cAMP als second messenger die Information von Peptidhormonen in der Zelle weiterleitet und verstärkt (Eckert et al., 2000). Ein solches Peptidhormon ist Arginin-Vasotocin (AVT). Bei A6-Zellen, einer Zelllinie aus dem Nierenepithel von *Xenopus*, führte die Gabe von AVT, über eine Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels, zu einer signifikanten Erhöhung des Amilorid-sensitiven Na^+ -Stroms (Kokko et al.,

1994). Auch am Froschcolon wurde eine Stimulation des Na^+ -Transportes durch AVT nachgewiesen (Krattemacher und Clauss, 1988).

In dem folgenden Experiment sollte deshalb untersucht werden, ob AVT den beobachteten cAMP-Effekt erklären kann und als physiologischer Auslöser der cAMP-Wirkung in Frage kommt. Dazu wurde eine Endkonzentration von $5 \mu\text{M}$ AVT in ORi eingesetzt.

Ausgehend von einem Plateauwert von $278 \pm 26 \text{ nA}$ wurde AVT appliziert. Innerhalb von 10 min. kam es zu einem signifikanten Stromanstieg auf $435,7 \pm 16,3 \text{ nA}$ (**Abb. 9**). Der Amilorid-sensitive Anteil des Gesamtstroms erhöhte sich um $28 \pm 12 \%$ ($N = 1, n = 3$). Der durch AVT aktivierte Strom war zu $89 \pm 0,5 \%$ durch Amilorid hemmbar. Allerdings gab es auch $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC exprimierende Oocyten ($N = 2, n = 5$), deren Natriumstrom nicht durch AVT stimulierbar war.



Abb. 9: Wirkung von AVT auf den Klemmstrom $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ – ENaC exprimierender Oocyten

Die Superfusion von H_2O -injizierten Oocyten mit AVT hatte keinen Effekt auf den Klemmstrom (**Abb. 10**). Unter ORi betrug der Gesamtstrom $53 \pm 7 \text{ nA}$, nach AVT-Zugabe $52 \pm 6 \text{ nA}$ ($N = 1, n = 7$). Diese Kontrolle demonstriert den spezifischen Effekt des Hormons auf den exogenen Na^+ -Kanal.

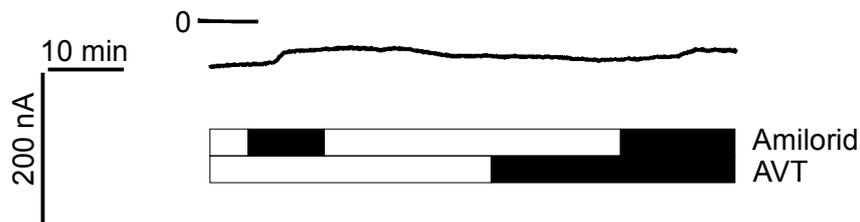


Abb. 10: Superfusion einer H₂O-injizierten Oocyte mit AVT

3.5 Glibenclamid aktiviert unabhängig von cAMP den Natriumstrom $g_{\alpha\beta\gamma}$ ENaC-exprimierender Oocyten

Glibenclamid ist ein Inhibitor des Sulfonylharnstoffrezeptors (Aguilar-Bryan et al., 1995) und des CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (Schultz et al., 1996, Sheppard und Robinson, 1997). Darüber hinaus wird es zur Therapie des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt, da es die Insulinsekretion anregt (Forth et al., 1993). Chraibi und Horisberger (1999) zeigten, dass Glibenclamid sowohl den klonierten ENaC des Frosches, als auch den ENaC aus der menschlichen Lunge (hENaC) bei Expression in *Xenopus* Oocyten stimuliert. Um einen möglichen Regulator des $g_{\alpha\beta\gamma}$ ENaC zu untersuchen, wurde eine Stammlösung von 0,2 M Glibenclamid in DMSO angesetzt. Die eingesetzte Endkonzentration von Glibenclamid im Versuch betrug 100 μ M.

Durch die Applikation von 100 μM Glibenclamid erhöhte sich der Gesamtstrom (I_m) signifikant von 276 ± 32 nA auf 524 ± 41 nA ($N = 2$, $n = 14$). Der Amilorid-sensitive Natriumstrom stieg um 117 ± 31 % ($N = 2$, $n = 10$). Wie in **Abb. 11** dargestellt, führte eine zusätzliche cAMP-Superfusion [50 μM] zu einer weiteren Stimulation des I_m von 524 ± 41 nA auf 1467 ± 170 nA ($N = 2$, $n = 10$). Ausgehend von dem durch Glibenclamid erreichten Maximum stieg I_{ami} nochmals um 804 ± 97 nA, was einer zusätzlichen Aktivierung des Amilorid-sensitiven Na^+ Stroms von 193 ± 17 % durch cAMP entspricht ($N = 2$, $n = 10$).

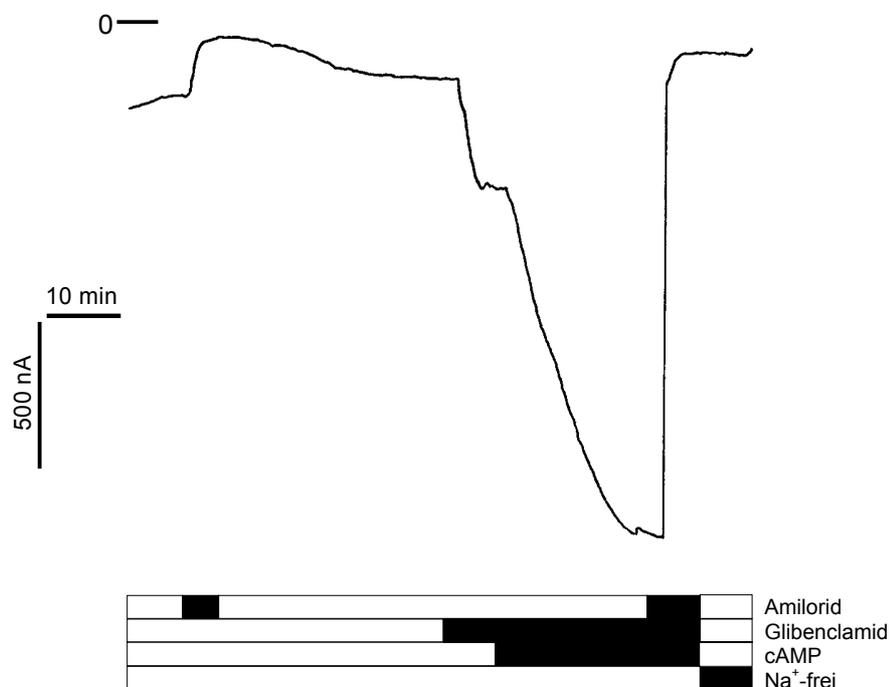


Abb.11: Wirkung von Glibenclamid [100 μM] und cAMP [50 μM] auf eine $gp\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimierende Oocyte

Anschließend sollte untersucht werden, ob diese zusätzliche Stimulation auch zu beobachten ist, wenn zuerst cAMP und anschließend zusätzlich Glibenclamid appliziert wird. In dieser Versuchsabfolge wurde der Gesamtstrom infolge der cAMP-Superfusion signifikant von 262 ± 26 nA auf 1351 ± 155 nA erhöht (N = 2, n = 7). Der Amilorid-sensitive Na^+ Strom stieg dabei um 410 ± 47 %. Wie in **Abb. 12** gezeigt, führte die folgende Gabe von Glibenclamid zu einer weiteren Aktivierung des Gesamtstroms um 334 ± 46 nA auf 1685 ± 194 nA. Der durch $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma\text{ENaC}$ -vermittelte I_{ami} stieg zusätzlich um 321 ± 47 nA, was einer Aktivierung um 26 ± 2 % entspricht (N = 2, n = 7).

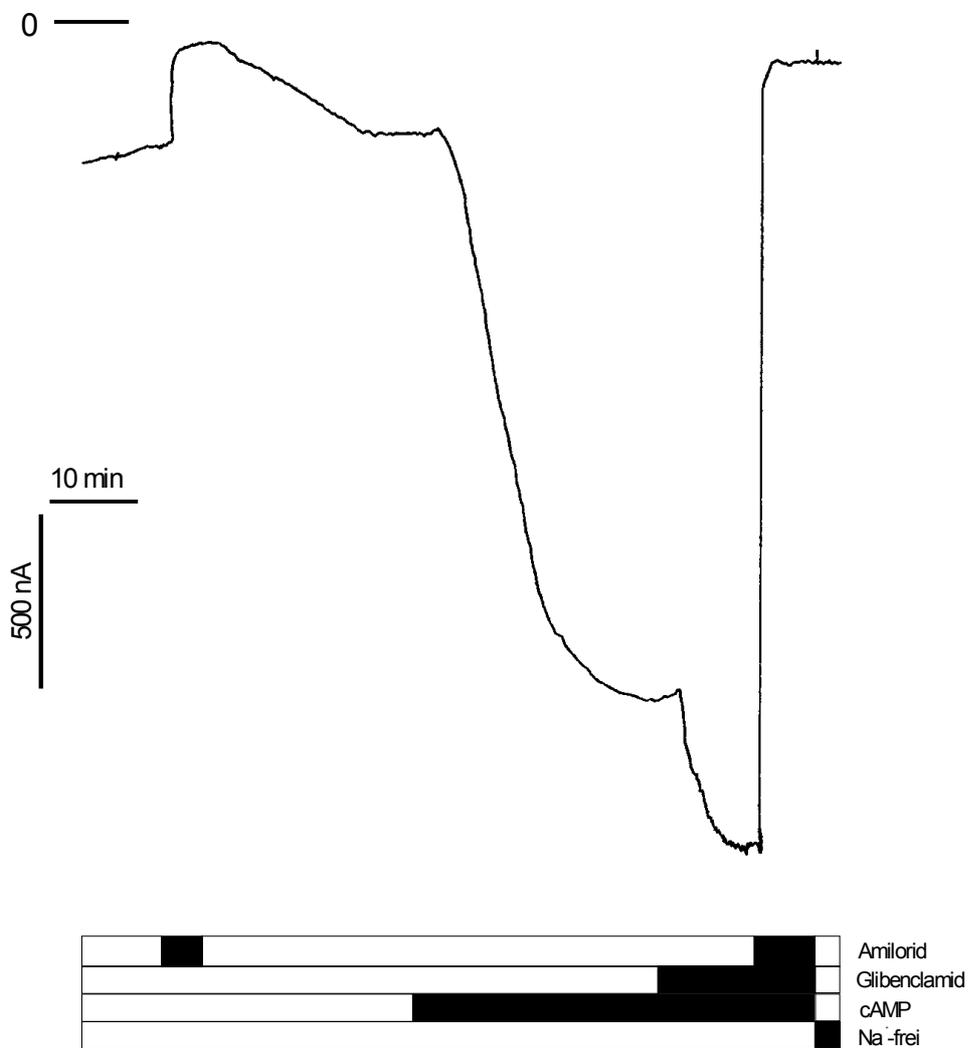


Abb. 12: Effekt von cAMP und Glibenclamid auf den Klemmstrom einer $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma\text{-ENaC}$ exprimierenden Oocyte

Um zu überprüfen, ob der Glibenclamid-Effekt auch noch auftritt, wenn man zuvor die cAMP-Konzentration vervierfacht, wurden in den folgenden Experimenten 200 μ M cAMP eingesetzt. In diesen Versuchen erhöhte cAMP den Gesamtstrom von 240 ± 43 nA auf 903 ± 106 nA ($N = 1, n = 4$). I_{ami} stieg um 483 ± 128 %. Die zusätzliche Perfusion mit Glibenclamid führte auch hier zu einer weiteren Aktivierung des Gesamtstroms um 184 ± 54 nA auf 1086 ± 120 nA. Der Amilorid-sensitive Na^+ Strom stieg durch Glibenclamid nochmals um 124 ± 18 nA, was einer Zunahme von $14 \pm 0,3$ % entspricht.

Gleich, in welcher Reihenfolge cAMP und Glibenclamid appliziert wurden und wie hoch die cAMP-Konzentration war, stets konnte eine zusätzliche Aktivierung des Natriumstroms durch Glibenclamid nachgewiesen werden.

3.6 Unter gleichzeitiger Amiloridapplikation kann Glibenclamid nicht den Strom $g_{\alpha\beta\gamma}$ -ENaC exprimierender Oocyten stimulieren

Die folgende Messreihe sollte Aufschluss darüber geben, ob Glibenclamid tatsächlich spezifisch den Amilorid-sensitiven Na^+ Strom beeinflusst. Hierfür wurde die Oocyte nach Erreichen eines stabilen Plateaus unter ORi zunächst mit Amilorid superfundiert. Anschließend erfolgte zusätzlich die Gabe von Glibenclamid. Wie in **Abb. 13** dargestellt, reduzierte Amilorid den Strom von 310 ± 43 nA auf 59 ± 14 nA ($N = 2, n = 5$). Unter gleichzeitiger Amiloridwirkung ließ sich der Strom im Folgenden durch Glibenclamid nicht mehr aktivieren.

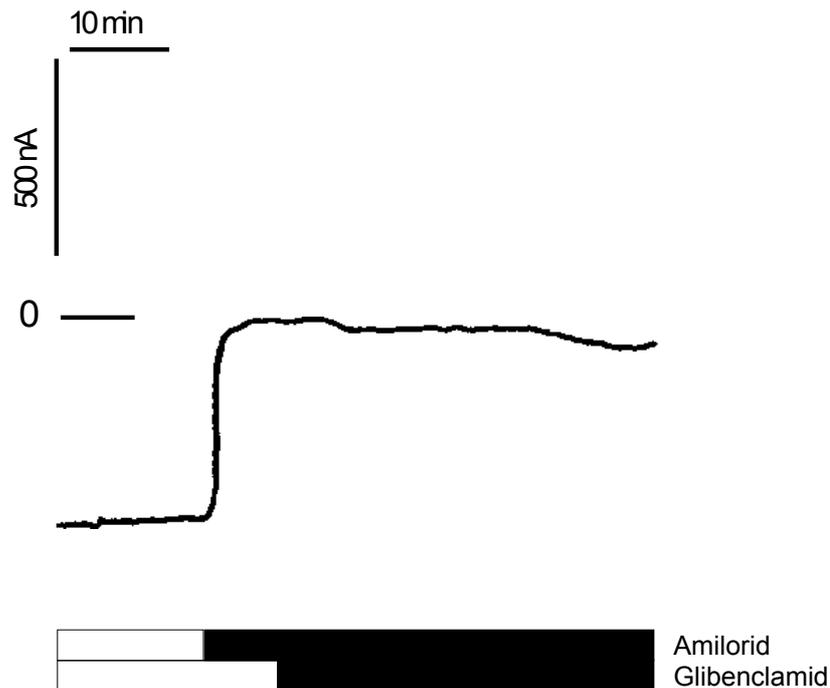


Abb. 13: Superfusion einer $g\alpha\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimierende Oocyte mit Glibenclamid bei gleichzeitiger Amiloridapplikation

3.7 Glibenclamid hat keinen Effekt auf die Leitfähigkeiten nativer Oocyten

Bislang ist nicht bekannt, auf welchem Weg Glibenclamid den Natriumstrom von Oocyten beeinflusst, die den *Xenopus*-ENaC oder die vorliegende Kanalchimäre exprimieren. Um einen Effekt auf native Oocyten ausschließen zu können, wurden als Negativkontrolle H_2O – injizierte Oocyten mit Glibenclamid superfundiert, die keine fremden Kanäle exprimieren. Wie **Abb. 14** beweist, zeigte Glibenclamid keine signifikante Wirkung auf native Oocyten. Der Gesamtstrom unter ORi betrug 19 ± 5 nA, unter Glibenclamid 18 ± 5 nA ($N = 1$, $n = 4$). Während der Superfusion mit ORi konnte eine endogene Amilorid-sensitive Leitfähigkeit von 6 ± 2 nA ($= 33 \pm 5$ %) beobachtet werden. Die absolute Amilorid-sensitive Leitfähigkeit unter Glibenclamid betrug ebenfalls 6 ± 2 nA ($= 37 \pm 5$ %).

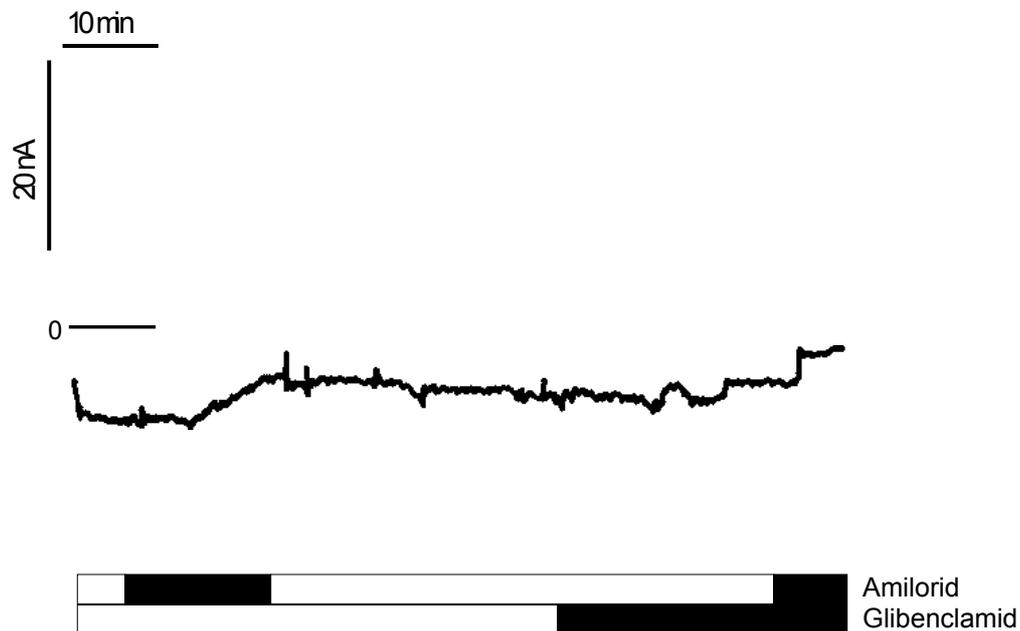


Abb. 14: Originalstromaufzeichnung einer H₂O-injizierten Oocyte nach Superfusion mit Glibenclamid

3.8 Der Gesamtstrom $\alpha\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimierender Oocyten wird nicht durch Glibenclamid gesteigert

Nun sollte untersucht werden, ob eine vergleichbare Stimulation des Natriumstroms erfolgt, wenn die ENaC- α -Untereinheit aus dem Meerschweinchen durch die α -Untereinheit aus dem Rattencolon ersetzt wird. In diesem Fall stieg der Gesamtstrom nur geringfügig von 373 ± 46 nA (ORi) auf 386 ± 42 nA (Glibenclamid). Wie die **Abb. 15** zeigt, erhöhte sich I_{ami} unter Glibenclamid von 306 ± 45 nA auf 353 ± 37 nA, was einer Zunahme von 17 % entspricht (N = 3, n = 5).

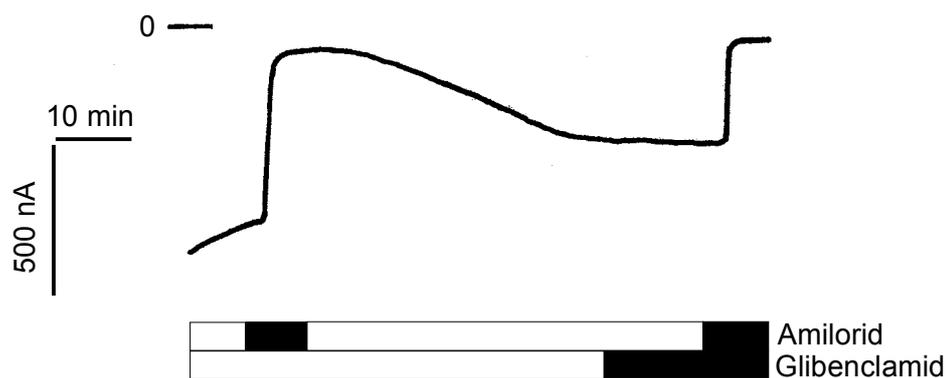
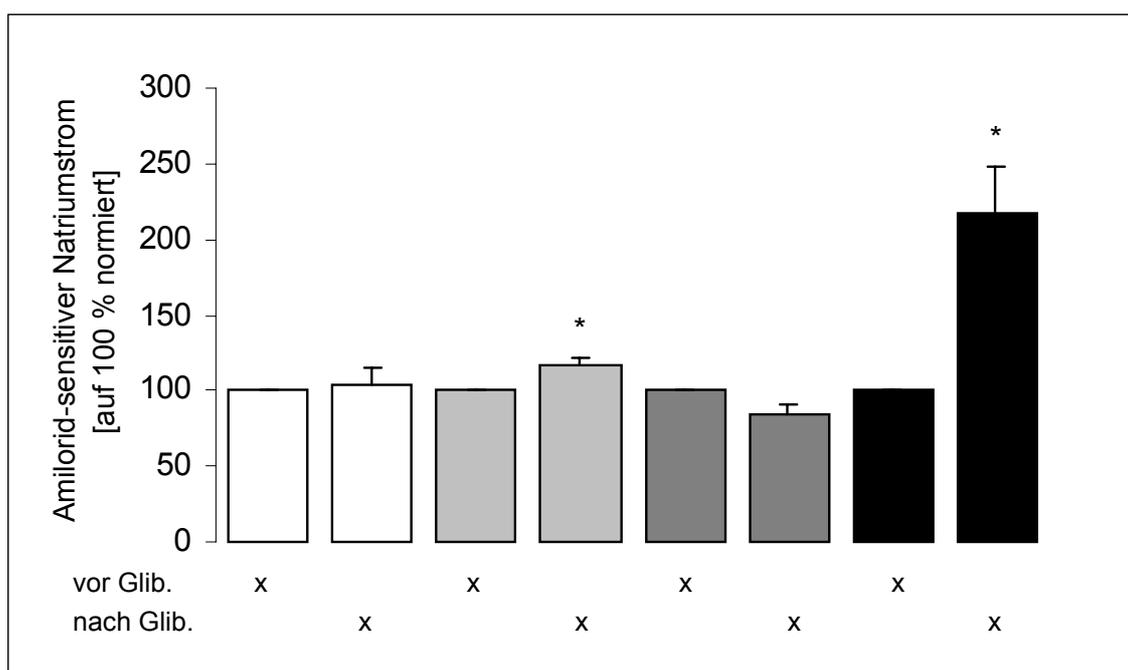


Abb. 15: Stromkurve einer $r\alpha x\beta\gamma$ -ENaC exprimierenden Oocyten nach Perfusion mit Glibenclamid

Die **Abb. 16** zeigt eine Übersicht der unterschiedlichen Wirkung von Glibenclamid auf H_2O -injizierte Oocyten und Oocyten, die verschiedene ENaCs exprimierten.



- H_2O -injizierte Oocyte (N = 1; n = 4)
- $r\alpha x\beta\gamma$ -ENaC (N = 2; n = 5)
- $gp\alpha x\beta\gamma$ -ENaC unter gleichzeitiger Amiloridapplikation (N = 2; n = 5)
- $gp\alpha x\beta\gamma$ -ENaC (N = 2; n = 10)

Abb. 16: Vergleich des Glibenclamideffektes auf H_2O - und ENaC-injizierte Oocyten

3.9 Swap-Mutationen in der ENaC- α -Untereinheit können Hinweise auf den Angriffspunkt von Glibenclamid liefern

Um zu untersuchen, ob der ENaC selbst das direkte Ziel für Glibenclamid sein könnte, wurden Natriumkanäle in Oocyten exprimiert, bei denen der C- oder N-Terminus der α -Untereinheit entweder von der Ratte (r) oder dem Meerschweinchen (gp) stammte. Diese wurde mit $\alpha\beta\gamma$ kombiniert. Bei den Domain-Swaps wird der C-Terminus der Ratte von 108 Aminosäuren gebildet, beim Meerschweinchen handelt es sich um 82 Aminosäuren. Der N-Terminus der Ratte besteht aus den Aminosäuren 587-656, der des Meerschweinchens aus den Aminosäuren 617-699. Die beiden transmembranären Domänen (M1 und M2) hängen jeweils an der extrazellulären Schleife (loop).

3.9.1 Die Chimäre $gp\alpha-r/x\beta\gamma$ ENaC wird durch Glibenclamid stimuliert

Bei dieser Mutante stammt der C-Terminus der α -Untereinheit von der Ratte, der Rest des Proteins vom Meerschweinchen. Wie in **Abb. 17** dargestellt, erhöhte Glibenclamid den Gesamtstrom signifikant von 187 ± 46 nA (ORi) auf 439 ± 131 nA ($N = 3, n = 7$). I_{ami} stieg von 160 ± 31 nA um 266 ± 103 nA auf 427 ± 126 nA (= 155 ± 37 %).



Abb. 17: Effekt von Glibenclamid auf den Strom einer $gp\alpha-r/x\beta\gamma$ – ENaC exprimierenden Oocyte

3.9.2 Glibenclamid erhöht den r-gp α -r/x $\beta\gamma$ - ENaC-vermittelten Natriumstrom

Diese Chimäre besitzt beide intrazellulären Termini von der Ratte, die extrazelluläre Schleife stammt vom Meerschweinchen. Hier stimulierte Glibenclamid den Gesamtstrom signifikant 240 ± 24 nA auf 405 ± 28 nA (**Abb. 18**). I_{ami} stieg von 150 ± 12 nA auf 313 ± 24 nA, was einer Aktivierung von 115 ± 17 % entspricht (N = 3, n = 9).



Abb. 18: Wirkung von Glibenclamid auf eine r-gp α -r/x $\beta\gamma$ -ENaC exprimierende Oocyte mit Glibenclamid

3.9.3 r-gp α /x $\beta\gamma$ ENaC reagiert sensitiv auf Glibenclamid

Hier wurde die α -Untereinheit aus dem N-Terminus der Ratte und dem loop sowie dem C-Terminus des Meerschweinchens konstruiert. Der Gesamtstrom r-gp α /x $\beta\gamma$ -exprimierender Oocyten wurde durch Glibenclamid signifikant von 263 ± 18 nA auf 483 ± 29 nA erhöht (N = 3, n = 8). Wie in der **Abb. 19** dargestellt, stieg I_{ami} von 164 ± 26 auf 411 ± 35 nA. Dies entspricht einer Stimulation des Amilorid-sensitiven Stroms um 174 ± 22 %.

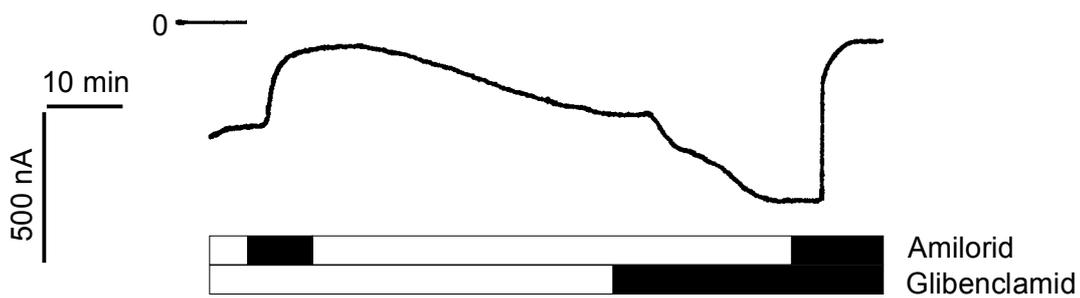


Abb. 19: Einfluss von Glibenclamid auf den Klemmstrom einer $r\text{-gp}\alpha/x\beta\gamma$ – ENaC exprimierenden Oocyte

3.9.4 $r\alpha\text{-gp}/x\beta\gamma$ ENaC wird durch Glibenclamid stimuliert

Diese Mutante besitzt den N-Terminus sowie die extrazelluläre Schleife des Rattenkanals, der C-Terminus stammt vom Meerschweinchen. Die Superfusion mit Glibenclamid erhöhte den Gesamtstrom signifikant von 412 ± 51 nA auf 559 ± 87 nA (**Abb. 20**). I_{ami} stieg von 387 ± 51 nA auf 551 ± 83 nA ($N = 4$, $n = 12$). Dies entspricht einer Stimulation des Amilorid-sensitiven Stroms um $41 \pm 7\%$.

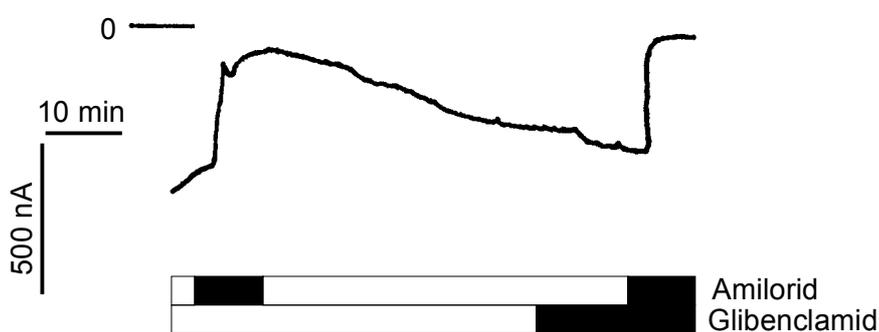


Abb. 20: Effekt von Glibenclamid auf eine $r\alpha\text{-gp}/x\beta\gamma$ -ENaC exprimierende Oocyte

3.9.5 Glibenclamid aktiviert den gp-r α -gp/x $\beta\gamma$ -ENaC vermittelten Natriumstrom

gp-r α -gp/x $\beta\gamma$ -ENaC besitzt beide Termini vom Meerschweinchen, der extrazelluläre Peptidanteil wurde von dem Rattenklon angefügt. In diesem Fall bewirkte Glibenclamid einen signifikanten Anstieg des Gesamtstroms von 320 ± 63 nA auf 380 ± 66 nA (N = 2, n = 7). Wie in **Abb. 21** dargestellt, führte die Applikation der Versuchssubstanz zu einer Erhöhung des I_{ami} von 249 ± 47 nA auf 380 ± 66 nA. Dies entspricht einer Aktivierung des Amilorid-sensitiven Stroms von 43 ± 3 %.

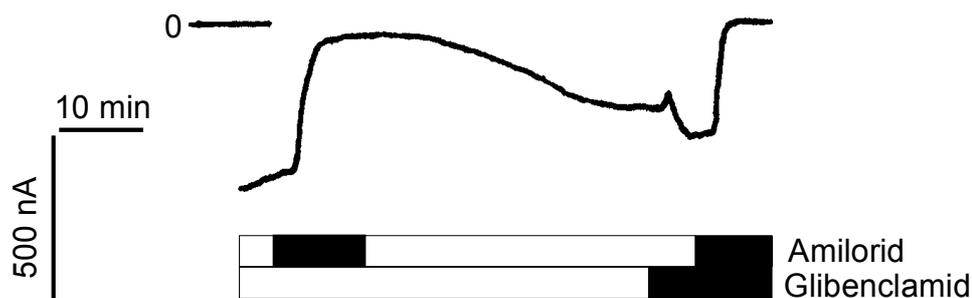


Abb. 21: Einfluss von Glibenclamid auf eine gp-r α -gp/x $\beta\gamma$ -ENaC exprimierende Oocyte

3.9.6 gp-r α /x $\beta\gamma$ – ENaC wird positiv durch Glibenclamid beeinflusst

Die α -Untereinheit dieser Chimäre wird aus der äußeren Schleife und dem C-Terminus der Ratte gebildet, der N-Terminus wurde vom Meerschweinchenklon angehängt. Die Superfusion der Oocyten mit Glibenclamid resultierte in einer signifikanten Erhöhung des Gesamtstroms von 503 ± 70 nA auf 618 ± 86 nA (**Abb. 22**). Währenddessen stieg I_{ami} von 404 ± 66 nA auf 549 ± 83 nA (N = 1, n = 7). Dies entspricht einer Zunahme des Amilorid-sensitiven Na⁺ Stroms um 41 ± 8 %.

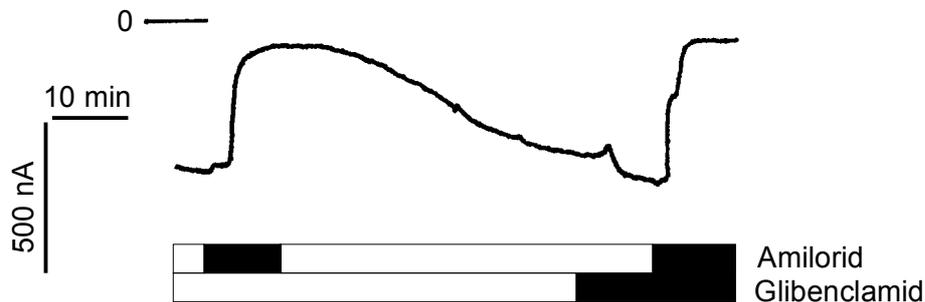


Abb. 22: Wirkung von Glibenclamid auf eine gp-r α /x $\beta\gamma$ – ENaC exprimierende Oocyte

Zur Übersicht sind in **Tab. 7** alle Swap-Mutanten aufgelistet. Sucht man nach möglichen Korrelationen zwischen den verschiedenen ENaC-Chimären und dem Ausmaß des Glibenclamideffektes, so fällt auf, dass alle Chimären mit der extrazellulären Schleife von der Ratte einen signifikant niedrigeren Anstieg des Natriumstroms zeigten. Er lag mit durchschnittlich 42 % deutlich unter der Stimulation der anderen Mutanten, ist aber noch signifikant unterschiedlich zu dem Glibenclamideffekt auf den Amilorid-sensitiven Natriumstrom r α x $\beta\gamma$ -ENaC exprimierender Oocyten.

Tab. 7: Vergleich des Glibenclamid-Effektes auf Oocyten, die verschiedene ENaC-Chimären exprimieren.

Chimäre	Intrazellulärer N-Terminus	Extrazelluläre Schleife	Intrazellulärer C-Terminus	Stimulation von I_m [%]	Stimulation von I_{ami} [%]	n
gp α -r/x $\beta\gamma$	gp	gp	rat	138 \pm 30 [*]	155 \pm 37 [*]	7
r-gp α -r/x $\beta\gamma$	rat	gp	rat	76 \pm 11 [*]	115 \pm 17 [*]	9
r-gp α /x $\beta\gamma$	rat	gp	gp	85 \pm 6 [*]	174 \pm 22 [*]	8
r α -gp/x $\beta\gamma$	rat	rat	gp	33 \pm 8 [*]	41 \pm 7[*]	12
gp-r α -gp/x $\beta\gamma$	gp	rat	gp	21 \pm 3 [*]	43 \pm 3[*]	7
gp-r α /x $\beta\gamma$	gp	rat	rat	24 \pm 3 [*]	41 \pm 8[*]	7
gp α x $\beta\gamma$	gp	gp	gp	110 \pm 22 [*]	215 \pm 36 [*]	10
r α x $\beta\gamma$	rat	rat	rat	4 \pm 3	17 \pm 5 [*]	5

4. Diskussion

4.1 Struktur und Funktion biologischer Membranen

Jede Zelle wird durch eine Plasmamembran von der Umgebung getrennt. Aufgrund ihrer selektiven Permeabilität und verschiedenen Transportmechanismen kann die Zellmembran das intrazelluläre Milieu aufrecht erhalten. Das Plasmalemma fungiert jedoch nicht nur als Diffusionsschranke sondern erfasst mittels Oberflächenrezeptoren extrazelluläre Signale, beispielsweise Neurotransmitter und Hormone, und leitet diese Information in die Zelle weiter. Auch innerhalb der Zelle werden die Organellen durch Membranen vom cytosolischen Raum abgegrenzt. Diese Kompartimentierung ermöglicht den gleichzeitigen Ablauf verschiedener Reaktionen.

Biologische Membranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht und Proteinen. Die Membranlipide werden aufgrund ihrer chemischen Struktur in Phosphoglyceride, Sphingolipide und Sterine unterteilt. Die amphipatischen Lipide bestehen aus einem polaren Kopf und unpolaren Kohlenwasserstoffketten. Die hydrophoben Schwänze orientieren sich dabei zum Inneren des Lipidbilayers, während die hydrophilen Köpfe ins wässrige Milieu ragen. Lediglich unpolare Moleküle wie N_2 , O_2 , H_2 und CH_4 sowie kleine ungeladene, polare Moleküle (zum Beispiel CO_2) können ungehindert durch die Lipiddoppelschicht diffundieren.

Für die meisten membranspezifischen Funktionen sind die Proteine verantwortlich. Nach dem Flüssigmosaikmodell von Singer und Nicolson (1972) können diese lateral frei in der Lipidmatrix diffundieren. Sie fungieren beispielsweise als Enzyme, Oberflächenrezeptoren oder Transportproteine. Die Art und Quantität der Proteine einer Membran können stark variieren. So bestehen die stoffwechselaktiven Membranen der Mitochondrien aus ca. 75 % Proteinen, während die elektrisch isolierende Myelinschicht von Axonen weniger als 25 % Proteine enthalten.

Die Membranen haben auch die Aufgabe, einen kontrollierten Stoffaustausch zu ermöglichen. Im Falle der passiven Permeation unterscheidet man 3 Mechanismen:

- Bei der einfachen Diffusion löst das unpolare Molekül seine Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Wasser und durchdringt die Lipiddoppelschicht, bis es zu einem Konzentrationsausgleich kommt.
- Für Ionen, zum Beispiel Na^+ und K^+ , stellt die Lipidschicht eine Barriere dar, die nur mit Hilfe von integralen Membranproteinen überwunden werden kann. Hierfür bilden Kanalproteine wassergefüllte Poren, durch die die Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes diffundieren können. Die Größe der Ionen und geladene Gruppen innerhalb der Kanäle stellen entscheidende Selektivitätsfaktoren dar. Abgesehen von einigen Kanälen, die permanent geöffnet sind oder sich spontan öffnen, reagieren die meisten Membrankanäle auf spezifische Signale. So kann der Öffnungszustand je nach Kanaltyp durch Spannungsänderung, Liganden oder mechanische Reize reguliert werden.
- Carrier sind Membranproteine, die spezifisch ihr Substrat binden und unter reversibler Konformationsänderung auf der anderen Membranseite ins wässrige Medium entlassen. Da die Anzahl und Geschwindigkeit der Carrier begrenzt ist, zeigt diese erleichterte Diffusion eine Sättigungskinetik auf. Weiterhin ist der Carriertransport durch Substratanaloga kompetitiv hemmbar.

Während die oben dargestellten Permeationsmechanismen ohne Energieverbrauch und nur bis zum Konzentrationsausgleich erfolgen, benötigt der aktive Transport chemische Energie, da dieser selektive Transport gegen ein Konzentrationsgefälle stattfinden kann. Handelt es sich um einen primär aktiven Transport, wird die Energie aus der Hydrolyse von ATP und anderen Phosphagenen direkt für den Transportvorgang genutzt (zum Beispiel Na^+/K^+ -ATPase). Der sekundär aktive Transport nutzt den Konzentrationsgradienten eines Ions, meist Na^+ oder H^+ , als Energiequelle zum Transport einer anderen Substanz.

Einige Transporter befördern ihr Substrat in eine Richtung (Uniport), andere arbeiten als Cotransporter und transportieren zwei verschiedene Ionen oder Moleküle gemeinsam. Dabei kann der Cotransport in gleicher Richtung

(beispielsweise Na^+ -Glucose-Symport im Dünndarm) oder in entgegengesetzter Richtung (zum Beispiel Na^+/H^+ -Antiport am proximalen Nierentubulus der Säuger) erfolgen. Aktive Transportsysteme sind stets hochgradig selektiv und durch eine Michaelis-Menten-Kinetik charakterisiert (Alberts et al., 1995, Eckert et al., 2000, Storch und Welsch, 1994, Hanke et al., 1997).

4.2 Bau und Funktion von Epithelien

In höheren Organismen bedecken ein- oder mehrschichtige Abschlussgewebe innere und äußere Körperflächen. Sie bieten mechanischen Schutz und kontrollieren als selektive Permeabilitätsbarrieren den Stoffhaushalt zwischen verschiedenen Kompartimenten. Zu diesem Zweck sind die Epithelzellen durch tight junctions (Zonula occludens) miteinander verbunden. Diese Verschlusskontakte verhindern die freie Diffusion von Stoffen auf dem parazellulären Weg und begrenzen die laterale Beweglichkeit der Membranproteine.

Typisches Kennzeichen von Epithelzellen ist ihr asymmetrischer Aufbau. Man unterscheidet eine, dem Außenmedium zugewandte, apikale (mucosale) und eine an die Blutseite angrenzende basolaterale (serosale) Membran. Damit diese Membranen verschiedene Funktionen ausüben können, unterscheiden sie sich in ihrer Ausstattung mit Transportproteinen und anderen Komponenten. So findet man zum Beispiel die Na^+/K^+ -ATPase nur in der basolateralen Membran.

Für den transepithelialen Transport existieren zwei verschiedenen Möglichkeiten. Der transzelluläre Weg führt durch die Epithelzelle und ist von den spezifischen Transportproteinen in der apikalen und basolateralen Membran abhängig. Im Gegensatz dazu erfolgt der parazelluläre Transport über die Zellzwischenräume durch die tight junctions. Je nach Gewebeart und dessen Funktion sind die tight junctions mehr oder weniger durchlässig.

4.3 Epithelialer Natriumkanal (ENaC)

Der elektrogene Natriumtransport von Epithelien wird durch hochselektive Na^+ -Kanäle in der apikalen Membran und der Na^+/K^+ -ATPase gewährleistet. Natrium diffundiert entsprechend seines elektrochemischen Gradienten in die Zelle. Das notwendige Konzentrationsgefälle wird durch die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase generiert, indem die Membranpumpe 3 Natriumionen vom Zellinneren gegen 2 Kaliumionen von der Zellaußenseite befördert. Durch die Entfernung der Na^+ -Ionen aus dem Cytoplasma wird verhindert, dass sich Natrium intrazellulär anreichert und durch osmotische Veränderungen Wasser nachströmt.

Man findet den ENaC sowohl in absorbierenden als auch in sekretorischen Geweben (Garty und Palmer, 1997). Kennzeichnend für diesen Kanal ist seine Sensitivität gegenüber Amilorid sowie seine hohe Selektivität für Natriumionen gegenüber Kaliumionen (Garty und Benos 1988). Solche Amilorid-sensitiven Na^+ -Kanäle wurden bei Amphibien in der Haut (van Driessche et al., 1979), der Harnblase (Palmer et al., 1982) und dem Colon erforscht (Krattenmacher et al., 1988). Bei Säugetieren entdeckte man den ENaC im Nierenepithel (Almeida et al., 1982; Stanton 1989; Frindt et al. 1990), im Colon (Will et al., 1985), in den Atemwegen (Boucher et al., 1983; Knowles et al., 1984) sowie im Epithel von Schweißdrüsen (Quinton, 1981). Auch bei Invertebraten, wie dem Blutegel (Weber et al., 1993), oder der Wollhandkrabbe (Zeiske et al., 1992) gelang es, den ENaC elektrophysiologisch zu charakterisieren.

Interessanterweise wurden dem ENaC homologe Proteine bereits im Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Canessa et al., 1993; Chalife et al., 1993), ein Hinweis auf das frühe Auftreten des Kanals in der Evolution. Innerhalb dieses Fadenwurms sind die Proteine an der Mechanosensorik beteiligt. Da es durch Mutationen dieser Moleküle zur Neurodegeneration kommt, nannte man sie Degenerine. Inzwischen fasst man die epithelialen Na^+ -Kanäle und die Degenerine auch aufgrund ihrer gemeinsamen Membrantopologie zu einer gemeinsamen Überfamilie zusammen (Benos und Stanton, 1999). Zu dieser Deg/ENaC-Überfamilie zählen inzwischen 5 verschiedene Natriumkanaltypen:

1. Der epitheliale Natriumkanal (ENaC)
2. Die Degenerine

3. Die brain sodium channels (BNaCs), die nur im Gehirn und Neuronen von Säugern nachgewiesen wurden (Price et al., 1996; Waldmann et al., 1996; Bassiliana et al., 1997; Garcia-Anoveros et al., 1997; Waldmann et al., 1997).
4. Der FMRFamid regulierte Natriumkanal wurde in Neuronen der Schnecke *Helix aspersa* entdeckt (Green et al. 1994) und 1995 von Lingueglia et al. kloniert.
5. Kürzlich gelang es, weitere Amilorid-sensitive Natriumkanäle in der Fruchtfliege *Drosophila* zu identifizieren: Pickpocket und Ripped pocket (Adams et al. 1998).

Diese Amilorid-sensitiven Na⁺-Kanäle besitzen die gleiche Membrantopologie und stellen vermutlich alle tetraheteromere Proteine dar (Mano und Driscoll, 1999), die sich allerdings in ihrer Ionenselektivität, ihrer Affinität für Amilorid, ihrem Öffnungsmechanismus und ihrer Funktion unterscheiden (Alvarez de la Rosa, 2000).

Aufgrund der Selektivität für Natrium und der Sensitivität gegenüber Amilorid werden die epithelialen Natriumkanäle verschiedener Gewebe in unterschiedliche Klassen eingeteilt (Garty und Palmer, 1997): so besitzen die hoch selektiven ENaCs („H-Typ“) einen $K_{1/2}$ -Wert für Amilorid von $< 1 \mu\text{M}$ und eine sehr geringe Kaliumleitfähigkeit. Die Einzelkanalleitfähigkeit für diese Kanäle beträgt 4-5 pS.

Durch Isolierung der mRNA des ENaC aus dem Rattencolon (rENaC) und Expression derselben in *Xenopus laevis* Oocyten (Canessa et al., 1994) erfolgte die Klonierung eines gesamten epithelialen Natriumkanals und dessen molekulare Beschreibung. Der ENaC besteht aus drei homologen Kanaluntereinheiten, die mit α , β und γ bezeichnet werden. Wie die **Abb. 23** zeigt, besitzt jede dieser Untereinheiten einen kurzen intrazellulären N- und C-Terminus, zwei transmembranäre Domänen und eine große extrazelluläre Schleife (Mc Nicholas et al., 1997). Das aktuelle Modell von Firsov et al. (1998) geht davon aus, dass sich der gesamte Kanal aus 2 α - und je einer β - und γ - Untereinheit zusammensetzt und somit als Heterotetramer vorliegt (**Abb. 22**).

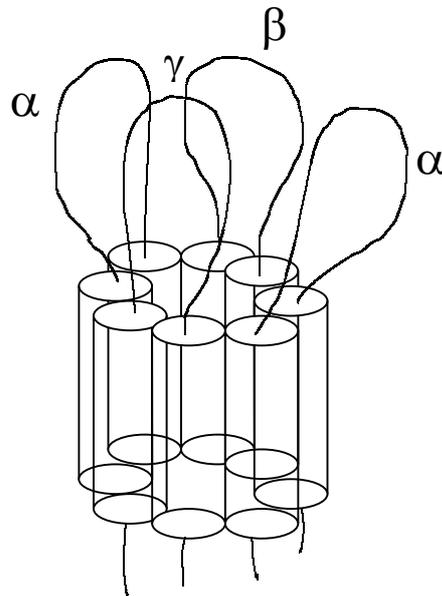
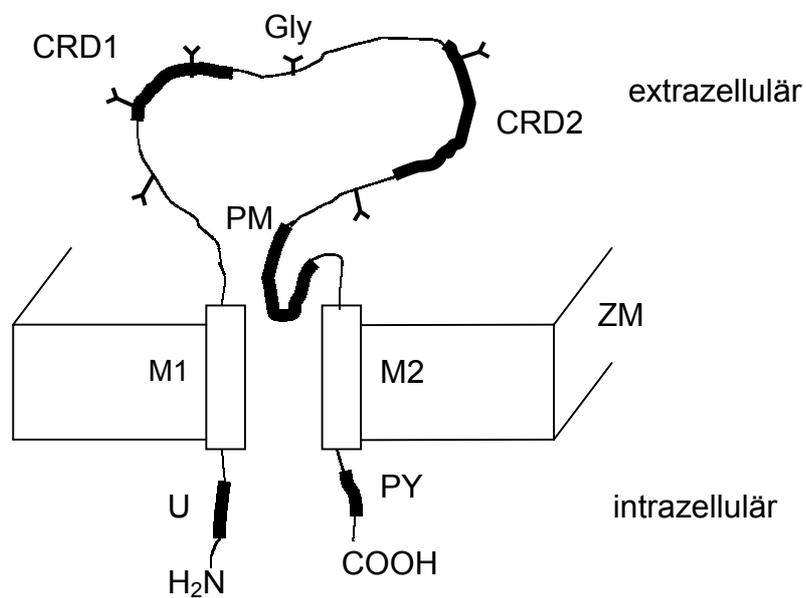


Abb. 22: Schematische Darstellung des ENaC



CRD: Cystein-reiche Domäne; Gly: Glykosylierungsstelle; M1 und M2: transmembranäre Domäne; PM: pre-M2-Schleife; PY: PY-Motiv; U: Ubiquitinierungsstelle; ZM: Zellmembran

Abb. 23: Funktionelle Domänen einer α -ENaC –Untereinheit (verändert nach Benos et al. 1999)

Der cytoplasmatische N-Terminus nimmt an verschiedenen Schlüsselfunktionen des ENaC teil. So ist er für das Schaltverhalten des Kanals (gating) ebenso wichtig (Chang et al., 1996, Grunder et al., 1997), wie für die Zusammenlagerung der Untereinheiten und den Transport an die Zelloberfläche (Chalfant et al., 1999 b, Benos et al., 1999). Weiterhin bestimmt der N-Terminus auch die Lebensdauer des Na⁺-Kanals mit. Die Ubiquitinierung von Lysinresten der α - und β - Untereinheit markieren das Protein für die Endocytose und folgende Degradation (Staub et al., 1997). Durch die Regulierung der Lebensdauer lässt sich die Anzahl der ENaCs in der Membran verändern.

Die extrazelluläre Domäne stellt fast 70 % des Kanalproteins dar. Jede ENaC-Untereinheit besitzt mehrere Glykosylierungsstellen (Canessa et al., 1994 b). Kennzeichnend sind zwei konservierte Cystein-reiche Domänen, von denen Firsov und Mitarbeiter (1999) annehmen, dass sie eine Rolle beim Transport des Kanals an die Zellmembran spielen. Die extrazelluläre Schleife beinhaltet außerdem eine hochaffine Bindungsstelle für Amilorid (Kieber-Emmons et al., 1999, Schild et al., 1997).

Die Domäne III besteht aus hydrophoben Segmenten. Die erste membrandurchspannende Domäne (M1) schließt sich an den N-Terminus an. Die zweite transmembranäre Domäne (M2) ist an der Bildung der Kanalpore beteiligt (Mano et al., 1999) und beeinflusst die Amiloridbindung (Alvarez de la Rosa et al., 2000) ebenso wie die Ionenselektivität (Kellenberger et al., 1999). Eine der M2-Domäne direkt vorangehende pre-M2-Schleife taucht ebenfalls in die Membran ein und ist vermutlich an der Bildung des Selektivitätsfilters und der Kanalpore beteiligt (Benos et al., 1999).

Der intrazellulär lokalisierte C-Terminus beinhaltet eine Prolin-reiche Region (PY-Motiv), die für die Bindung der Proteinligase Nedd4 entscheidend ist (Harvey et al., 1999). Diese Bindung von Nedd4 ermöglicht die Ubiquitinierung von Lysinresten des N-Terminus, was zur Endocytose und Degradation des ENaC führt (Dinudom et al., 1998). Damit fungiert Nedd4 als negativer Regulator des ENaC (Abriel et al. 1999 b).

Inzwischen sind wesentliche Mechanismen identifiziert, die den ENaC regulieren können. In Ergänzung zu den klassischen Faktoren wie Aldosteron (Garty, 2000) und Vasopressin (Marunaka et al., 1991, Kleyman et al., 1994, Verrey et al., 1995)

zeigten jüngste Forschungen, dass die Aktivität dieses Na^+ -Kanals auch durch völlig andere Wege modifiziert werden kann. Hier sind vor allem folgende Proteine zu nennen: CAP1 (channel activating protease) ist eine luminaire Serinprotease, die bei Coexpression mit dem ENaC in *Xenopus* Oocyten den Amilorid-sensitiven Strom verdoppelt (Vallet et al., 1998). Auch das Enzym Trypsin kann den ENaC-generierten Na^+ -Strom in Oocyten signifikant steigern (Chraïbi et al., 1998). Die bereits erwähnte Ubiquitinligase Nedd4 bindet, als Antwort auf einen erhöhten intrazellulären Na^+ -Spiegel (Dinudom et al., 1998), an die Prolin-reiche Region im C-Terminus der ENaC-Untereinheiten, was zur Ubiquitinierung mehrerer Lysinreste führt (Staub et al., 1996). Dies dient wiederum als Signal für eine Entfernung des Kanals aus der Membran und seiner anschließenden Degradation in Lysosomen (Alvarez de la Rosa et al., 2000). Auch der Chloridkanal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) ist in der Lage, den ENaC zu hemmen (Kunzelmann et al., 2000).

Neben diesen Proteinen wurden auch Einflüsse des intrazellulären pH-Wertes (Chalfant et al., 1999 a, Harvey, et al., 1999), sowie der Ca^{2+} - (Garty et al., 1997) und der Na^+ - Konzentration (Abriel et al., 1999 a) nachgewiesen.

Der ENaC ist direkt an der Aufrechterhaltung des extrazellulären Volumens und des Blutdruckes beteiligt (Volk et al., 2000). Seine zentrale Bedeutung für die Homöostase zeigt sich bei mutationsbedingten Krankheiten. Mutationen im C-Terminus der β - oder γ -Untereinheit führen zum sogenannten Liddle's Syndrom (Hummler, 1999). Durch einen konstitutiv aktivierten ENaC wird in den Nieren zuviel Na^+ konserviert und K^+ exkretiert (Warnock, 1999). Deshalb ist diese autosomal dominante Erbkrankheit neben einer metabolischen Alkalose und niedrigem Aldosteronspiegel auch durch Bluthochdruck und Hypokalämie gekennzeichnet (Garbers et al., 1999). Im Gegensatz dazu führt eine Punktmutation im N-Terminus der β -Untereinheit (Pradervand et al., 1998) zum Pseudohypoaldosteronismus (PHA Typ1). Durch die Unfähigkeit, des Patienten, Na^+ in den Nieren zu reabsorbieren und Kalium auszuscheiden, kommt es zum Salzverlust, niedrigen Blutdruck, sowie zur Hyperkalämie, metabolischer Acidose und Dehydrierung (Bonny et al., 2000).

4.4 Dosisabhängige Inhibierung des Na^+ -Stroms $\text{gp}\alpha\beta\gamma\text{-ENaC}$ exprimierender Oocyten durch Amilorid

Das Diuretikum Amilorid (3,5-diamino-6-chloropyrazinoylguanidin) ist ein spezifischer Blocker epithelialer Na^+ -Kanäle. Durch submikromolare Dosen dieses Diuretikums wird der ENaC schnell und reversibel inhibiert (Barbry und Lazdunski, 1996). Neben der Ionenselektivität und der Einzelkanalleitfähigkeit ist die Sensitivität gegenüber Amilorid und seinen Analoga Benzamil und Phenamil das Hauptkriterium für die Einteilung der epithelialen Na^+ -Kanäle in verschiedene Gruppen (Garty und Palmer, 1997).

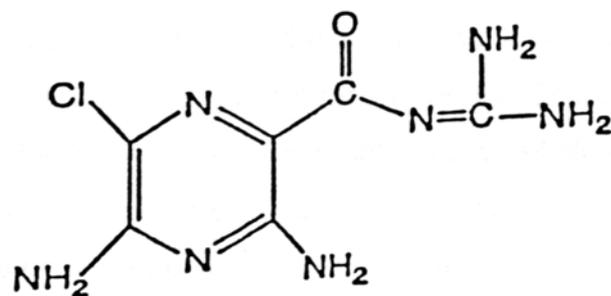


Abb. 24: Strukturformel von Amilorid

Wie in der **Abb. 24** dargestellt, besteht Amilorid aus einem Pyrazinring und einer Guanidingruppe. Beide Molekülanteile sind wichtig für die hochaffine Bindung an den ENaC (Garty et al., 1997). Entscheidend für die Blockierung des Kanals ist die positiv geladene Guanidinhälfte, die mit Na^+ -Ionen um negativ geladene Stellen der Kanalpore konkurriert (Kleyman et al., 1999). Der substituierte Pyrazinring ist vermutlich für die Stabilisierung der Bindung verantwortlich (Kieber-Emmons et al., 1999). Da die Affinität von Amilorid mit steigender extrazellulärer Na^+ -Konzentration abnimmt, wird ein kompetitiver Mechanismus angenommen (Alvarez de la Rosa et al., 2000). Neben der extrazellulären Na^+ -Konzentration und dem extrazellulären pH-Wert hängt die Affinität des ENaC für Amilorid von der transmembranären Spannung ab (Garty et al., 1997). So steigert eine Hyperpolarisation der Zellmembran linear die Affinität für Amilorid, indem die on-Rate des Kanals zunimmt und die off-Rate abnimmt (Warncke et al., 1985). Analysen dieser Spannungsabhängigkeit wiesen darauf hin, dass die geladene

Guanidinhälfte etwa 20 % der Membranspannung „spürt“, wenn das Molekül gebunden wird (Palmer, 1984; Hamilton et al., 1985; Fyfe et al., 1998). Die dargestellten Beobachtungen lassen vermuten, dass sich die Amiloridbindungsstelle im transmembranären elektrischen Feld befindet. Während es denkbar wäre, dass die Blockierung durch Amilorid eine spannungsabhängige Konformationsänderung des Kanalproteins beinhaltet, erscheint es wahrscheinlicher, dass Amilorid den Kanal wie einen molekularen „Stopfen“ verschließt (Palmer et al., 1989), da die Hemmung des Kanals durch das ungeladene Analogon CDPC (6-chloro-3,5-diaminopyrazin-2-carboxamid) weniger spannungsabhängig war (Palmer, 1991).

Durch Mutationsanalysen gelang es Schild et al. (1997), verschiedene Aminosäuren zu identifizieren, die an der Amiloridbindung beteiligt sind. Ismailov et al. (1997) zeigten, dass die Aminosäurereste 278-283 (WYRFHY) der ENaC- α -Untereinheit der Ratte an der Amiloridbindung beteiligt sind. Diese 6 Aminosäuren sind in allen bisher klonierten und sequenzierten α -ENaCs konserviert (Benos und Stanton, 1999). Kieber-Emmons et al. (1999) setzten erfolgreich einen antiidiotypischen Antikörper ein, der Amilorid nachahmt und gegen eine Amiloridbindungsstelle der α -Untereinheit des bovinen und des Maus-ENaC gerichtet ist.

Inzwischen existiert ein schlüssiges Modell, das die ENaC-Amilorid-Interaktion veranschaulicht (Kleyman et al., 1999, Kieber-Emmons et al., 1999, Alvarez de la Rosa et al., 2000): Hierbei wird davon ausgegangen, dass Amilorid mit dem Na⁺-Kanal an 2 verschiedenen Stellen agiert. Zum einen ist der Selektivitätsfilter in der Kanalpore entscheidend, zum anderen sind auch 6 Aminosäurereste der extrazellulären Schleife, zumindest der α -Untereinheit, wichtig. Zunächst blockiert die geladene Guanidinhälfte von Amilorid den Selektivitätsfilter, der von der H2 Domäne des α -, β - und γ -ENaC gebildet wird. Die H2 Domäne (auch pre-M2-Region genannt) besteht aus hydrophoben Aminosäuren, die an der Bildung der Kanalpore beteiligt sind, und geht der zweiten membrandurchspannenden Domäne des ENaC (M2) unmittelbar voraus. Der Pyrazinring des Amiloridmoleküls interagiert nun mit einer spezifischen Region der extrazellulären Schleife (Aminosäuren 278-283) und stabilisiert somit die Bindung an den Na⁺-Kanal.

Einen eindeutigen Beleg für die Richtigkeit des beschriebenen Modells könnte die Entschlüsselung der dreidimensionalen Struktur des ENaC durch Kristallisation erbringen.

Als Maß für die Empfindlichkeit gegenüber Amilorid dient der k_i -Wert. Er gibt diejenige Blockerkonzentration an, bei der 50 % des Natriumtransportes gehemmt werden. Hochaffine Na^+ -Kanäle besitzen einen k_i -Wert $< 1 \mu\text{M}$ (Benos et al., 1992), bei niedrigaffinen Na^+ -Kanälen beträgt der k_i -Wert $> 1 \mu\text{M}$.

Wie bereits Fuller et al. (1995) bewies, ist es möglich, die ENaC-Untereinheiten verschiedener Spezies in Oocyten zu vollständigen, funktionsfähigen Amilorid-sensitiven Kanälen zu komplettieren. Auch der in dieser Arbeit charakterisierte $g\alpha\alpha\beta\gamma$ -ENaC zeigte als Hybridkanal typische Eigenschaften, die mit denen anderer hochaffiner ENaCs übereinstimmen.

Der unter Amiloridapplikation ermittelte k_i -Wert für $g\alpha\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimierende Oocyten betrug $130 \pm 21 \text{ nM}$. Dieses Ergebnis belegt nicht nur, dass der exprimierte Natriumkanal hochaffin für Amilorid ist sondern auch, dass er als Hybridkanal ein pharmakologisches Profil besitzt, wie es von anderen ENaCs berichtet wird. Für verschiedene klonierte ENaCs wurden bei Expression in *Xenopus* Oocyten folgende k_i -Werte für Amilorid bestimmt: 670 nM für *Xenopus* α,β,γ -ENaC (Puoti et al., 1995), 100 nM bei dem Ratten α,β,γ -ENaC (Canessa et al., 1994 a), 200 nM für den humanen ENaC (Langloh et al., 2000), 70 nM für den bovinen α -ENaC (Fuller et al., 1995) und 103 nM im Falle des Maus α,β,γ -ENaC (Ahn et al., 1999).

Dass Amilorid in der beschriebenen Versuchsreihe nicht immer den gesamten Natriumstrom blockieren konnte, liegt an Amilorid-insensitiven Na^+ -Kanälen der Oocytenmembran. Bisher wurden verschiedene endogene Na^+ -Leitfähigkeiten in der nativen *Xenopus* Oocyte nachgewiesen: während eine Klasse der Na^+ -Kanäle insensitive gegenüber dem Kanalblocker TTX (Tetrodotoxin) ist (Charpentier et al., 1995), lassen sich andere spannungsabhängige Na^+ -Kanäle durch TTX blockieren (Parker et al., 1987, Krafe et al., 1992) und ähneln in dieser Eigenschaft Natriumkanälen von Nervenzellen. Bossi et al. (1998) und Charpentier et al. (1999) zeigten, dass die Kanalpopulation, welche durch Depolarisation induziert wird, durch intrazelluläres Ca^{2+} reguliert werden kann. Eine andere Amilorid-

insensitive Na^+ -Leitfähigkeit wird durch NH_4^{4+} aktiviert (Cougnon et al., 1996, Burckhardt et al., 1997). Diese Na^+ -Kanäle sind allerdings neben Na^+ auch für NH_4^{4+} permeabel. Interessanterweise wiesen Weber et al. (1995) bei Oocyten jedes dritten Krallenfrosches spannungsunabhängige Na^+ -Kanäle nach, die sich sensitiv gegenüber Amilorid und Phenamil verhielten. Allerdings konnte das Amiloridanalogue Benzamil diesen hochselektiven Na^+ -Kanal nicht inhibieren, so dass sich dieser endogene Amilorid-sensitive Na^+ -Kanal eindeutig von dem fremd exprimierten ENaC unterscheidet, der sich durch Benzamil blockieren lässt (Kleyman et al., 1988). Abgesehen von dem unterschiedlichen pharmakologischen Profil kommt erleichternd hinzu, dass die durch endogene Kanäle generierten Ionenströme sehr klein sind im Vergleich zu den Strömen, die durch die fremden Ionenkanäle hervorgerufen werden (Weber, 1999).

4.5. cAMP aktiviert den $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC vermittelten Na^+ -Strom in *Xenopus* Oocyten

Zur Untersuchung des Na^+ -Stroms $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC exprimierender Oocyten wurden der Ringerlösung 50 μM membrangängiges Chlorophenylthio-cAMP und 1 mM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin) zugesetzt. IBMX hemmt Phosphodiesterasen, die cAMP spalten würden. Durch den „Cocktail“ aus cAMP und IBMX wurde der intrazelluläre cAMP-Spiegel konstant hoch gehalten. Innerhalb weniger Minuten nach der cAMP-Superfusion erhöhte sich der Amilorid-sensitive Na^+ -Strom von 183 ± 23 nA auf 1230 ± 241 nA ($N = 5$, $n = 15$). Dieser signifikanten Stimulation des I_{ami} um 1046 ± 225 nA entspricht eine Aktivierung von 532 ± 88 %. Aufgrund der cAMP-Wirkung nahm die Differenzkurve einen steileren Verlauf, was die Zunahme des Amilorid-sensitiven Na^+ -Stroms verdeutlicht. Das Umkehrpotenzial verschob sich von -10 mV auf +20 mV ($N = 2$, $n = 5$), da vermehrt Na^+ aus dem extrazellulären Medium in die Oocyte einströmen konnte. Somit näherte sich das Umkehrpotenzial unter cAMP dem Gleichgewichtspotenzial von Na^+ an. Dieses wird bei einer extrazellulären Na^+ -Konzentration von 90 mM und einer geschätzten Na^+ -Konzentration in der Oocyte von 23 mM (Kusano et al., 1982) bzw. 10 mM (Costa et al., 1989) mit 46 mV und 61 mV angegeben. Das ermittelte

Umkehrpotenzial von +20 mV stimmt weiterhin mit der hohen Selektivität des ENaC für Na^+ gegenüber K^+ überein.

Während der klonierte ENaC aus dem Rattencolon (Awayda et al., 1996) und die ENaC α -Untereinheit des renalen Rinderepithels (Fuller et al., 1995) im *Xenopus*-Expressionsmodell nicht durch cAMP aktiviert werden konnten, ist der $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC offenbar in *Xenopus* Oocyten durch cAMP regulierbar. Aufgrund des schnellen Anstiegs des Natriumstroms direkt nach Zugabe von cAMP, bewirkt der second messenger vermutlich eine Stimulation bereits in der Membran vorhandener, aber noch ruhender, Natriumkanäle. Tatsächlich wurde mehrfach belegt, dass die Gesamtzahl der ENaCs in der Zellmembran die Anzahl der aktiven Na^+ -Kanäle deutlich übertrifft (Firsov et al., 1996). Da der cAMP-induzierte Stromanstieg jedoch über 500 % betrug, ist es wahrscheinlich, dass es zusätzlich zu einem vermehrten Einbau von neuen ENaCs in die Oocytenmembran kam.

In den vorliegenden Experimenten war auch eine Erhöhung des Amilorid-sensitiven Na^+ -Stromes xENaC-exprimierender Oocyten durch cAMP um 79% (N = 3, n = 7) zu beobachten. Der relativ langsame Stromanstieg lässt primär auf eine Translokation und Exocytose neuer Kanäle schließen. Entscheidend ist jedoch, dass dieser Effekt signifikant kleiner war im Vergleich zu der cAMP-Wirkung auf den $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -Hybridkanal. Offensichtlich wurde die hohe cAMP-Sensitivität des $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC durch die $\text{gp}\alpha$ -Untereinheit vermittelt. Experimente mit $\text{gp}\alpha\text{r}\beta\gamma$ -ENaC belegten, dass die Regulation durch cAMP tatsächlich auf dem α -ENaC des Meerschweinchens beruht (Schnizler et al., 2000).

Das durch die Adenylatcyclase gebildete cAMP nimmt als second messenger je nach Effektorprotein an vielfältigen Regulationsvorgängen teil. Bei Invertebraten wurde für die Blutegelhaut (Weber et al., 1993) und die Krabbenkieme von *Eriocheir sinensis* (Riestenpatt et al., 1994) eine Erhöhung des Na^+ -Transportes durch cAMP nachgewiesen. In Epithelzellen der Schnecke *Lymnaea stagnalis* erzielte cAMP vermutlich über eine Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers einen veränderten Na^+ -Transport (de With et al., 1988). An der Krötenblase stimulierte der second messenger den Strom einwertiger Kationen durch Ca^{2+} -sensitive Kanäle in der apikalen Membran (van Driessche et al., 1987). Am Froschcolon erfolgte nach cAMP-Applikation ein Anstieg des elektrogenen Na^+ -Transportes

(Krattenmacher et al., 1988). In A6-Zellen wurden durch cAMP G-Protein-sensitive Na⁺-Kanäle aktiviert (Prat et al., 1993).

4.6 Arginin-Vasotocin (AVT) kann als primärer messenger für die cAMP-Wirkung auf den gp α x β γ -ENaC vermittelten Na⁺-Strom fungieren

Durch die Bindung eines fettunlöslichen Hormons an einen membranständigen Rezeptor, der an ein stimulatorisches G-Protein gekoppelt ist, wird im Zellinneren die Bildung von second messengern ausgelöst. Ein solcher second messenger ist cAMP. Dieses Molekül leitet die Informationen von Peptidhormonen in der Zelle weiter und verstärkt das Hormonsignal (Eckert et al., 2000). Durch die Aktivierung von Effektorproteinen werden schnelle Antworten ermöglicht. Bisher wurden Untersuchungen an verschiedenen Geweben veröffentlicht, die einen Einfluss der antidiuretisch wirkenden Peptidhormone Arginin-Vasopressin (AVP=ADH) und Arginin-Vasotocin (AVT) auf den Na⁺-Transport belegen.

Die Effekte von Vasopressin auf dichte Epithelien (d.h. mit hohem elektrischen Widerstand) werden durch den basolateralen V₂-Rezeptor vermittelt, der die Adenylatcyclase aktiviert (Els et al., 1989). Dieses Enzym erhöht den intrazellulären cAMP-Spiegel (Djelidi et al., 1997). Daher ist es auch möglich, die stimulierende Wirkung von AVP auf den Na⁺-Strom in Sammelrohrzellen der Ratte durch membrangängiges cAMP (Schafer et al., 1990) oder durch Aktivatoren der Adenylatcyclase, wie zum Beispiel Forskolin oder Cholera toxin, nachzuahmen (Garty et al., 1997). Durch die Rauschanalyse an Epithelien von Amphibien konnte gezeigt werden, dass der AVP-induzierte Na⁺-Transport auf einer erhöhten Dichte von offenen Kanälen in der apikalen Membran basiert (Helman et al., 1983, Li et al., 1982).

Auf der Suche nach dem physiologischen Auslöser des cAMP-Effektes auf den in *Xenopus* Oocyten exprimierten gp α x β γ -ENaC wurde das Nonapeptid Arginin-Vasotocin appliziert. Dieses Hormon unterscheidet sich nur in der 3. Position der Aminosäuresequenz von AVP und kommt bei „allen Wirbeltieren mit Ausnahme der Säugetiere“ vor (Penzlin, 1991). Wie AVP bei Säugern die

Wasserpermeabilität erhöht, kontrolliert AVT beispielsweise die Permeabilität der Amphibienhaut. Dass es sinnvoll war, AVT im Versuch einzusetzen, liegt darin begründet, dass die β - und γ -Untereinheit des vorliegenden Hybridkanals vom Krallenfrosch stammten und Säugetiere zumindest entsprechende Rezeptoren für AVT besitzen könnten. Immerhin stimmt die Aminosäuresequenz bei AVP und AVT bis auf eine Position überein. Demnach ist die Abfolge der 8 anderen Aminosäuren hochkonserviert. Die einzige Substitution ist wahrscheinlich nicht für die Hormonwirkung entscheidend. Eventuell dient die ausgetauschte Aminosäure lediglich dazu, die essentiellen Aminosäuren in eine Position zu bringen, „die für die biologische Aktivität der Nonapeptide wichtig ist“ (Eckert et al., 2000). So ist AVT zwar das natürlich vorkommende antidiuretisch wirksame Hormon bei Anuren, aber der Na^+ -Transport der „Krötenblase wird durch ein breites Spektrum chemisch verwandter Peptidhormone der Neurohypophyse stimuliert“ (Higgins et al., 1988). Hierzu zählen neben AVP und AVT auch Oxytocin und (das nicht bei Säugetieren vorkommende) Mesotocin. Daher konnten zahlreiche Laborstudien, die den Na^+ -Transport an Epithelien von Amphibien untersuchten, auch durch Einsatz von AVP Regulationsmöglichkeiten des Gewebes erfolgreich charakterisieren. Allerdings zeigte AVT in den Experimenten an der Krötenblase die größte Wirksamkeit auf den Kurzschlussstrom (Higgins et al., 1988). Diese Ergebnisse lassen Higgins und seine Mitarbeiter (1988) auf einen einzigen Rezeptortyp in der Krötenblase schließen, der die Stimulation des Na^+ -Transportes durch antidiuretische Peptide vermittelt. Dieser Rezeptor wäre demnach nicht in der Lage, zwischen verschiedenen Vasopressinanaloga zu unterscheiden, so wie es bei Säugetieren aufgrund der selektiven V_1 und V_2 AVP-Rezeptoren möglich ist.

Während die Applikation von 5 μM AVT bei Wasser-injizierten Oocyten keinerlei Wirkung zeigte, führte AVT bei $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC exprimierenden Oocyten zu einem schnellen transienten Stromanstieg. Der Gesamtstrom wurde innerhalb von 10 min. signifikant von $278 \pm 26,3$ nA auf $435,7 \pm 16,3$ nA ($n = 3$) erhöht. I_{ami} stieg um durchschnittlich 28 % an. Dass es bei einigen Oocyten während der AVT-Superfusion nicht zu einer Zunahme des Amilorid-sensitiven Stroms kam, könnte an einer entwicklungspezifischen Expression der AVT-Rezeptoren in der Zellmembran liegen. Ähnliche Ergebnisse referiert auch Schaffert (1999), die eine

signifikante Stimulation des $g\alpha\beta\gamma$ -ENaC durch AVP nachwies. Auch hier waren einige der *Xenopus* Oocyten insensitiv gegenüber AVP.

Die Stimulation des in Oocyten exprimierten $g\alpha\beta\gamma$ -ENaC durch AVT lässt darauf schliessen, dass dieses Hormon als first messenger für die cAMP-Wirkung auf den Na^+ -Strom fungieren kann.

Für die molekularen Ereignisse, die der AVP-Wirkung auf den Na^+ -Strom zugrunde liegen, gibt es zwei mögliche Erklärungen: die durch das cAMP aktivierte Proteinkinase A (PKA) könnte durch direkte Phosphorylierung von Kanaluntereinheiten bereits in der Membran vorhandene, aber noch ruhende, ENaCs aktivieren. Andererseits ist es ebenso möglich, dass die PKA Mediatorproteine (beispielsweise Elemente des Cytoskelettes) modifiziert, die dann die Insertion neuer Na^+ -Kanäle aus intrazellulären Pools in die apikale Membran vermitteln (Benos et al., 1995).

Für beide Alternativen existieren mehrere Indizien. Gegen eine Rekrutierung neuer Kanäle aus intrazellulären Pools spricht eine Untersuchung von Morris et al. (1998), die belegt, dass die Erhöhung des ENaC-vermittelten Na^+ -Transportes durch AVT in A6-Zellen nicht durch Zerstörung des Mikrotubuli-Systems unterbunden wird. Im Froschcolon steigert AVT die Na^+ -Permeabilität, ohne Korrelation zur Membrankapazität (Krattenmacher und Clauss, 1988). Weiterhin gelang es, in einigen patch-Experimenten an der Krötenblase, einen 5-pS-Kanal durch die PKA zu aktivieren (Frings et al., 1988). Ein anderer Hinweis für eine direkte Phosphorylierung des ENaC durch die PKA stammt von Untersuchungen des gereinigten renalen Na^+ -Kanals. Dieser konnte in planaren Lipiddoppelschichten durch die katalytische Untereinheit der PKA reguliert werden (Oh et al., 1993, Ismailov et al., 1994).

Andererseits gibt es ebenso Hinweise, die für einen AVP-induzierten Neueinbau der Na^+ -Kanäle in die apikale Membran sprechen. So demonstrierten Marunaka und Eaton (1991) bei Einzelkanalmessungen an A6-Zellen, dass Vasopressin die Anzahl der Kanäle pro Patchareal signifikant steigerte, ohne die Öffnungswahrscheinlichkeit zu verändern. Ein ähnlicher Effekt wurde an A6-Zellen durch Applikation von Prostaglandin E_2 (PGE_2) erreicht (Kokko et al., 1994). PGE_2 ist in der Lage, cAMP zu erhöhen (Garty et al., 1997). Auch im Sammelrohr der Ratte führte cAMP zu einer Erhöhung der Kanalzahl, ohne die

Öffnungswahrscheinlichkeit zu beeinflussen (Frindt et al., 1995). Durch den verstärkten Einbau neuer Kanäle in die apikale Membran steigt die Membranfläche und damit ihre Kapazität an (Hanke et al., 1997). Eine solchen AVP- bzw. cAMP-induzierten Anstieg der elektrischen Kapazität wurde bereits für die Krötenblase (Stetson et al., 1982, Palmer und Lorenzen, 1983, Palmer und Speez, 1984, van Driessche et al., 1991) und A6-Zellen (Verrey et al., 1993) nachgewiesen. Ein weiteres Indiz für die AVP-vermittelte Insertion neuer Na⁺-Kanäle in die Membran von A6-Zellen erbrachten Experimente mit einem antiidiotypischen Antikörper, der den ENaC-vermittelten Strom blockieren kann (Kleyman et al., 1994). Hier führte die Behandlung mit AVP zu einer Verdopplung des Antigens, also der ENaC-Anzahl, in der apikalen Membran. Für eine Translokation der Na⁺-Kanäle aus dem Cytoplasma an die Zelloberfläche spricht auch die Beobachtung, dass der Einsatz von Brefeldin A bei A6-Zellen (Kleyman et al., 1994) den AVP-induzierten Anstieg des Na⁺-Stromes unterband. Da dieses Pilzmakrolid den intrazellulären Vesikeltransport verhindert und den Einbau neuer Proteine in die Membran blockiert (Shimkets et al., 1997), spricht die Beobachtung ebenfalls für eine Beteiligung intrazellulärer Proteine an der AVP-Wirkung. In *Xenopus* Oocyten, die einen Hybridkanal aus der gp α -Untereinheit und der Ratten β - und γ -Untereinheit (gp α r $\beta\gamma$ -ENaC) exprimierten, führte die Superfusion mit Brefeldin A ebenfalls zu einer signifikanten Hemmung des cAMP-induzierten Stromanstiegs (Schaffert, 1999).

Wie im vorliegenden Versuch an gp α x $\beta\gamma$ -ENaC exprimierenden Oocyten ist auch der stimulierende Effekt von AVP in der Krötenblase und im Sammelrohr der Kaninchenniere transient. Nach Erreichen eines Maximalwertes, sinkt der Na⁺-Strom in diesen Geweben wieder ab und das Epithel spricht auf eine erneute Applikation von AVP nicht mehr an (Garty et al., 1986, Chen et al., 1990). Im Sammelrohr der Ratte wurde hingegen eine anhaltende Erhöhung des Na⁺-Transportes durch AVP nachgewiesen (Benos et al., 1995, Barbry et al., 1996).

Einen bedeutenden Unterschied für die klonierten ENaCs auf die AVP-Exposition findet man zwischen verschiedenen Geweben, Spezies und Expressionssystemen. Während die Na⁺-Kanäle in der Rattenniere durch AVP und cAMP reguliert werden (Frindt et al., 1996), verhält sich das Rattencolon insensitiv

gegenüber cAMP (Bridges et al., 1984). Auch die Harnblase von Säugern reagiert auf AVP nicht mit einer veränderten Na^+ -Permeabilität (Garty et al., 1997). Die A6-Nierenepithelzellen des Frosches lassen sich hingegen ebenso durch AVP und cAMP stimulieren (Marunaka et al., 1991), wie die Krötenblase (Palmer et al., 1984, van Driessche et al., 1991) oder das Froschcolon durch AVT (Krattenmacher et al., 1988).

In diesem Zusammenhang steht auch die Frage nach möglichen Phosphorylierungszielen für die PKA. Bislang ist noch nicht eindeutig geklärt, ob die cAMP-aktivierte Proteinkinase Mediatorproteine oder den ENaC selbst modifiziert. Obwohl der klonierte ENaC des Rattencolons (rENaC) potenzielle Phosphorylierungsstellen für die cAMP-Wirkung besitzt (Benos et al., 1995), wird dieser Kanal weder in *Xenopus* Oocyten noch in planaren Lipiddoppelschichten durch cAMP reguliert (Awayda et al., 1996). Allerdings wiesen Stutts et al. (1995) eine aktivierende Wirkung der PKA auf den rENaC in transfizierten MDCK-Zellen (Madin Darby canine kidney cells) und in 3T3-Fibroblasten nach. In diesen Zellen aktivierte cAMP den Na^+ -Strom. Demnach müssen zellspezifische Komponenten des jeweiligen Expressionsmodells für den regulatorischen Unterschied verantwortlich sein. So könnten der *Xenopus* Oocyte Mediatoren (PKA-phosphorylierte Proteine) fehlen, die eine erfolgreiche Signaltransduktion ermöglichen. Denkbar wäre auch, dass die Oocyte selbst Faktoren bildet, die eine cAMP-vermittelte Stimulation des rENaC verhindern.

Im Gegensatz zum rENaC (Awayda et al., 1996) ließ sich der $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC in *Xenopus* Oocyten durch cAMP aktivieren. Für eine Phosphorylierung durch die PKA kommt bei der α -Untereinheit des Meerschweinchen-ENaCs nur eine Aminosäure in Frage (Schnizler et al., 2000). Dieses Serin an Position 449 liegt jedoch nicht im intrazellulären Bereich und ist außerdem auch in der Sequenz des Ratten-ENaC konserviert. Das Threonin im N-terminalen Bereich des $\text{gp}\alpha$ -ENaC (T49) sowie zwei Serinreste (S619, S635) im C-terminalen Bereich sind zwar nicht bei der Primärstruktur des Rattenklons zu finden (Schnizler et al., 2000), liegen aber auch nicht in einer typischen Konsensussequenz für eine Phosphorylierung durch die PKA (Kemp et al., 1994). Die Primärstruktur der α -Untereinheit des xENaC enthält keine Konsensussequenz, die als Nukleotidbindungsstelle in Frage kommt (Puoti et al., 1995). Sowohl der xENaC als auch der gpENaC sind im

nativen Gewebe (A6-Nierenzellen bzw. Colon) durch AVP bzw. cAMP stimulierbar (Marunaka et al., 1991, Verrey et al., 1993, Rechkemmer, persönliche Mitteilung). Allerdings wurde der $g\alpha\alpha\beta\gamma$ -ENaC in *Xenopus* Oocyten signifikant stärker aktiviert als der xENaC. Da die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der ENaC-Untereinheiten verschiedener Spezies keine konservierten intrazellulären PKA-Phosphorylierungsstellen besitzen (Garty und Palmer, 1997, Benos und Stanton, 1999), wäre es denkbar, dass nicht der Kanal selbst das direkte Ziel einer Phosphorylierung durch die PKA ist, sondern ein anderes Protein die Aktivität des ENaC beeinflusst. Andererseits gelang es Shimkets et al. (1998), eine Phosphorylierung der β - und γ - Untereinheit des Ratten-ENaC in MDCK-Zellen durch die PKA nachzuweisen. Hierbei phosphorylierte die PKA Serin- und Threoninreste im C-terminalen Bereich der Untereinheiten, während die α -Untereinheit nicht *de novo* phosphoryliert werden konnte. Der genaue Mechanismus, durch welchen die Phosphorylierung die Kanalaktivität verändert, muss noch entschlüsselt werden (Shimkets et al., 1998).

4.7 Über welche Mechanismen könnte Glibenclamid die ENaC-Chimäre aktivieren ?

Glibenclamid [N-p[2-(5-Chloro-2-methoxybenzamido)ethyl]benzensulfonyl-N-cyclohexylharnstoff] wird als Therapeutikum bei Diabetes mellitus Typ II eingesetzt, da es hier die noch vorhandene Insulinsekretion der β -Inselzellen im Pankreas anregt (Forth et al., 1993). Glibenclamid blockiert dabei Kaliumkanäle, die auch durch ATP inhibiert werden (Sheppard et al., 1997). Dadurch wird die Zellmembran depolarisiert, so dass Ca^{2+} über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in die Inselzelle einströmen kann (Ashcroft et al., 1992). Der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel bewirkt anschließend eine Freisetzung des granulär gespeicherten Insulins.

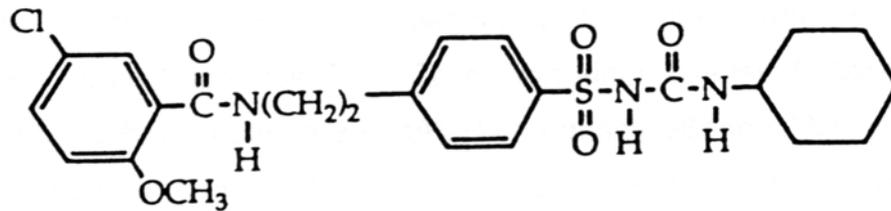


Abb. 25: Strukturformel von Glibenclamid

Wie in **Abb. 25** zu sehen, besteht das Molekül in der Mitte aus einem Sulfonamidanteil, dessen Amidstickstoff gleichzeitig Bestandteil eines Harnstoffrestes ist (Forth et al. 1993). Glibenclamid ist lipidlöslich und kann in seiner nichtionisierten Form in die Membran diffundieren (Ashcroft et al., 1992).

Glibenclamid ist ein starker Inhibitor des Sulfonylharnstoffrezeptors SUR (Aguilar-Bryan et al., 1995). Auch der CFTR wird durch dieses Sulfonylharnstoffderivat blockiert, allerdings mit einer niedrigeren Affinität als der SUR (Sheppard et al., 1997).

Auf der Suche nach Regulationsmöglichkeiten des ENaC zeigten Chraibi und Horisberger (1999), dass Glibenclamid sowohl den klonierten ENaC des Frosches, als auch den menschlichen ENaC (hENaC) bei Expression in *Xenopus* Oocyten stimulierte. Dabei stieg der Amilorid-sensitive Na^+ -Strom um 40 – 50 %. Einzelkanalstudien (excised patches) belegten, dass Glibenclamid zu einer Verdopplung der offenen Kanäle in der Zellmembran führte. Auch der transepitheliale Na^+ -Transport in A6-Zellen wurde signifikant gesteigert.

In den vorliegenden Experimenten erhöhte Glibenclamid signifikant den $\text{g}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC induzierten Gesamtstrom um 249 ± 34 nA. I_{ami} stieg innerhalb von 5 min. nach der Glibenclamidapplikation um $117 \pm 31\%$. Nach Erreichen eines stabilen Plateauwertes führte die zusätzliche Superfusion der $\text{g}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC

exprimierenden Oocyten mit cAMP zu einem weiteren Anstieg des Gesamtstroms um 962 ± 132 nA. Der Amilorid-sensitive Na^+ -Strom erhöhte sich durch cAMP um weitere $193 \pm 17\%$. Dieses Ergebnis belegt, dass auch der $\text{gp}\alpha\beta\gamma$ -ENaC in *Xenopus* Oocyten positiv von Glibenclamid beeinflusst wird. Die zusätzliche Stimulation durch Superfusion der Zellen mit einer zweiten Substanz war auch dann zu beobachten, wenn zuerst cAMP und anschließend cAMP in Kombination mit Glibenclamid verabreicht wurde. In diesem Fall erhöhte Glibenclamid I_m , ausgehend vom Maximalwert unter cAMP, um weitere 334 ± 46 nA. Der Amilorid-sensitive Na^+ -Strom stieg währenddessen um 321 ± 47 nA. Selbst eine vierfach höhere cAMP-Konzentration konnte den zusätzlichen Glibenclamid-Effekt nicht unterbinden. Diese Daten belegen eine von cAMP unabhängige Aktivierung des Na^+ -Stroms $\text{gp}\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimierender Oocyten durch Glibenclamid. Offenbar handelt es sich um additive Effekte, die durch verschiedene Aktivierungsmechanismen von cAMP und Glibenclamid hervorgerufen werden. Dass Glibenclamid tatsächlich den Amilorid-sensitiven Anteil des Klemmstroms beeinflusste, zeigten auch Versuche, in denen Glibenclamid gleichzeitig mit Amilorid appliziert wurde. In diesem Fall konnte das Sulfonylharnstoffderivat den Strom der $\text{gp}\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimierenden Oocyten nicht mehr erhöhen, da nun die ENaCs durch Amilorid blockiert waren.

Da die Superfusion H_2O -injizierter Oocyten mit Glibenclamid keinen Einfluss auf den Klemmstrom hatte, lässt sich eine Wirkung der Substanz auf native Oocyten ausschließen. Diese Kontrolle zeigt, dass es sich bei der oben beschriebenen Wirkung um einen ENaC-spezifischen Effekt handeln muss, der erst nach Expression des exogenen Na^+ -Kanals auftritt.

Wurde die α -Untereinheit des Meerschweinchen-ENaC durch die α -Untereinheit des Rattenklons ersetzt, stieg der Gesamtstrom unter Glibenclamid nicht mehr an. Da der Austausch der α -Untereinheit zwischen rENaC und gp -ENaC ausreicht, um die aktivierende Wirkung von Glibenclamid zu unterbinden, ist demnach die α -Untereinheit des Meerschweinchenklons für die Sensitivität gegenüber Glibenclamid verantwortlich. Dies stimmt mit Untersuchungen von Chraïbi und Horisberger (1999) überein. Die Autoren kombinierten verschiedene ENaC-Untereinheiten von der Ratte mit denen des Frosches. Durch ausbleibende Wirkung von Glibenclamid bei einigen Hybridkanälen konnte darauf geschlossen

werden, dass die α - und β - Untereinheit für die Glibenclamidwirkung essentiell sind, während die γ - Untereinheit keinen Einfluss auf das Ergebnis hatte. Dass der durch den $r\alpha\beta\gamma$ -ENaC generierte Amilorid-sensitive Na^+ -Strom in den vorliegenden Versuchen durch Glibenclamid nur um 17 % erhöht wurde, was signifikant niedriger ist als bei Oocyten, die den $gp\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimierten, stimmt ebenfalls mit den Aussagen von Chraïbi et al. (1999) überein. Der reine Rattenklon war in den von Chraïbi und Mitarbeitern durchgeführten Versuchen nicht durch Glibenclamid aktivierbar.

Bislang ist nicht geklärt, auf welche Weise Glibenclamid den Na^+ -Strom ENaC exprimierender Oocyten beeinflussen kann. Um zu untersuchen, ob der exogene Na^+ -Kanal selbst der direkte Angriffspunkt für Glibenclamid sein könnte, wurden Swap-Mutanten erstellt. Anschließend wurden ENaCs in Oocyten exprimiert, bei denen der C- und / oder N-Terminus der α -Untereinheit entweder von der Ratte oder dem Meerschweinchenklon stammte. Diese wurde stets mit der β - und γ -Untereinheit des *Xenopus*-ENaC kombiniert.

Alle ENaC-Chimären, bei denen die extrazelluläre Schleife der α -Untereinheit vom Meerschweinchenklon stammte, wurden durch Glibenclamid deutlich um über 100 % stimuliert. Wurde die extrazelluläre Schleife jedoch vom Ratten-ENaC gebildet, war der Glibenclamideffekt auf I_{ami} mit durchschnittlich 42 % signifikant niedriger. Dies deutet darauf, dass die Ectodomäne der ENaC- α -Untereinheit eine zentrale Bedeutung für die Glibenclamidwirkung besitzt. Da die Sensitivität des $r\alpha\beta\gamma$ -ENaC generierten Na^+ -Stroms gegenüber Glibenclamid in Oocyten noch geringer war im Vergleich zu den Swap-Mutanten, die die extrazelluläre Schleife der $r\alpha$ -ENaC-Untereinheit besaßen, könnten die transmembranären Domänen M1 und M2, die beide am loop hängen und in den beschriebenen Versuchen jeweils von der selben Spezies stammten, ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung des ENaC durch Glibenclamid spielen.

Der genaue Mechanismus, über den Glibenclamid den ENaC-vermittelten Na^+ -Strom in *Xenopus* Oocyten stimuliert, bleibt noch aufzuklären. Prinzipiell sind drei Angriffsorte denkbar: der CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), der SUR (sulfonylurea receptor) oder der ENaC selbst.

Der CFTR ist ein epithelialer Chloridkanal, der in apikalen Membranen von sekretorischen und absorbierenden Geweben vorkommt (Kunzelmann et al., 2000). So wird dieser Kanal beispielsweise in Schweiß- und Speicheldrüsen, im Colon, im respiratorischen Epithel und in renalen Zellen exprimiert (Ji et al., 2000). Wie der SUR gehört auch der CFTR zur Familie der ATP-binding cassette (ABC) Proteine (de la Rosa et al., 2000). Mutationen des cAMP-regulierten Chloridkanals führen zur Cystischen Fibrose, die unter anderem durch eine erhöhte Na^+ Reabsorption und eine defekte Cl^- -Sekretion gekennzeichnet ist (Schwiebert et al., 1998).

Mehrere Arbeitsgruppen belegten eine Inhibition des ENaC durch den CFTR (Briel et al., 1998, Chabot et al., 1999, Kunzelmann et al., 1997, Letz et al., 1997, Mall et al., 1996, Schreiber et al., 1999, Stutts et al., 1995). Eine CFTR-vermittelte Blockierung des ENaC wurde in den Atemwegen und dem Darm gesunder Menschen nachgewiesen (Mall et al., 1998a, Mall et al., 1998b). Die Coexpression des CFTR und des ENaC in MDCK-Zellen, NIH 3T3 Fibroblasten und *Xenopus* Oocyten demonstrierten ebenfalls die Hemmung des Amilorid-sensitiven Na^+ -Stroms durch die Aktivierung des Chloridkanals (Kunzelmann et al., 2000). Weitere Studien zeigten auch eine CFTR-abhängige Inhibition des ENaC in anderen Zelltypen, wie zum Beispiel in kultivierten Nierenzellen von Mäusen (Letz et al., 1997), A6-Zellen (Kunzelmann et al., 2000) und epithelialen Colonzellen der Ratte (Ecke et al., 1996). Der molekulare Mechanismus, wie der CFTR und ENaC miteinander interagieren, ist bisher nicht entschlüsselt. Es gibt jedoch verschiedene Hypothesen, die diese Wechselwirkung zu erklären versuchen. Einige Arbeitsgruppen postulieren eine direkte Protein-Protein-Interaktion (Ismailov et al., 1996, Kunzelmann et al., 1997). Eine solche direkte physikalische Wechselwirkung der beiden Kanäle konnte jedoch nicht bewiesen werden (Alvarez de la Rosa et al., 2000). Andere Indizien sprechen für eine Beteiligung von Proteinen des Cytoskeletts (Naren et al., 1997, Short et al., 1998, Wang et al., 1998). Eine Interaktion des CFTR und ENaC durch Bildung kurzer Aktinfilamente (Berdiev et al., 1996, Hug et al., 1995, Ismailov et al., 1997, Prat et al., 1995) ist ebenso denkbar, wie eine CFTR-kontrollierte Exo- und Endocytose des ENaC (Bowers et al., 1996, Bradbury et al., 1992, Lukacs et al., 1997, Spilmont et al., 1996, Takahashi et al., 1996). Weiterhin wird eine mögliche Regulierung des ENaC durch die intrazelluläre Cl^- -Konzentration oder den CFTR-generierten Cl^- -

Strom diskutiert (Briel et al., 1998, Chabot et al., 1999, Dinudom et al., 1993, Jiang et al., 1998). Dass auch G-Proteine zur bislang ungeklärten CFTR-Regulierung des Na⁺-Kanals beitragen könnten, deuten Studien an A6-Zellen an (Ohara et al., 1993). Stutts und seine Mitarbeiter (1997) beobachteten während Patch Clamp Versuchen, dass die Applikation von Proteinkinase A die Öffnungswahrscheinlichkeit des ENaC erhöhte. Dieser Effekt wurde durch die Coexpression des CFTR mit dem ENaC signifikant reduziert. Diesem Ergebnis zufolge kann die PKA in Anwesenheit des CFTR den ENaC nicht effektiv phosphorylieren.

Zahlreiche Veröffentlichungen belegen somit die Inhibierung des ENaC durch den CFTR. Da bekannt ist, dass der CFTR selbst durch Glibenclamid gehemmt wird (Schultz et al, 1996, Sheppard et al., 1997), könnte man die stimulierende Wirkung von Glibenclamid auf den untersuchten $g\alpha\alpha\beta\gamma$ -ENaC durch eine verhinderte Hemmung durch den CFTR erklären. Allerdings existieren bislang keine Hinweise darauf, dass der CFTR auch in nativen *Xenopus* Oocyten vorkommt (Chraibi et al. 1999, McNicholas et al., 1996), die als Expressionsmodell für den vorliegenden Natriumkanal dienen.

Wie bereits der CFTR, gehört auch der Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR) zur Familie der ABC-Proteine (Aguilar-Bryan et al., 1995). Interessanterweise gibt es einen hohen Grad an Homologie zwischen CFTR und SUR (Konstas et al. 2001), insbesondere in einer cytoplasmatischen Region, die an einer Protein-Protein Interaktion zwischen CFTR und ENaC beteiligt sein könnte (Ji et al., 2000, Kunzelmann et al., 1997). Der SUR ist ein großes Membranprotein von 140-170 kD (Skeer et al., 1994), das Sulfonylharnstoffe mit hoher Affinität bindet (Ashcroft et al., 1992). Als erster Sulfonylharnstoffrezeptor wurde der hochaffine SUR1 kloniert (Aguilar-Bryan et al., 1995). Hochaffine Bindungsstellen für Glibenclamid ($K_i \pm 10$ nM) wurden in den β -Zellen des Pankreas, im Herzen, in glatten Muskelzellen und im Gehirn nachgewiesen (Ashcroft et al., 1992). Studien am Rattenhirn zeigten, dass sich die Dichte und Verteilung der Bindungsstellen für Sulfonylharnstoffe während der Ontogenese verändern (Mourre et al., 1990). In den β -Zellen des Pankreas bildet der SUR1 gemeinsam mit dem gleichrichtenden (inwardly rectifying) Kaliumkanal Kir 6.2 einen ATP-abhängigen Kaliumkanal mit

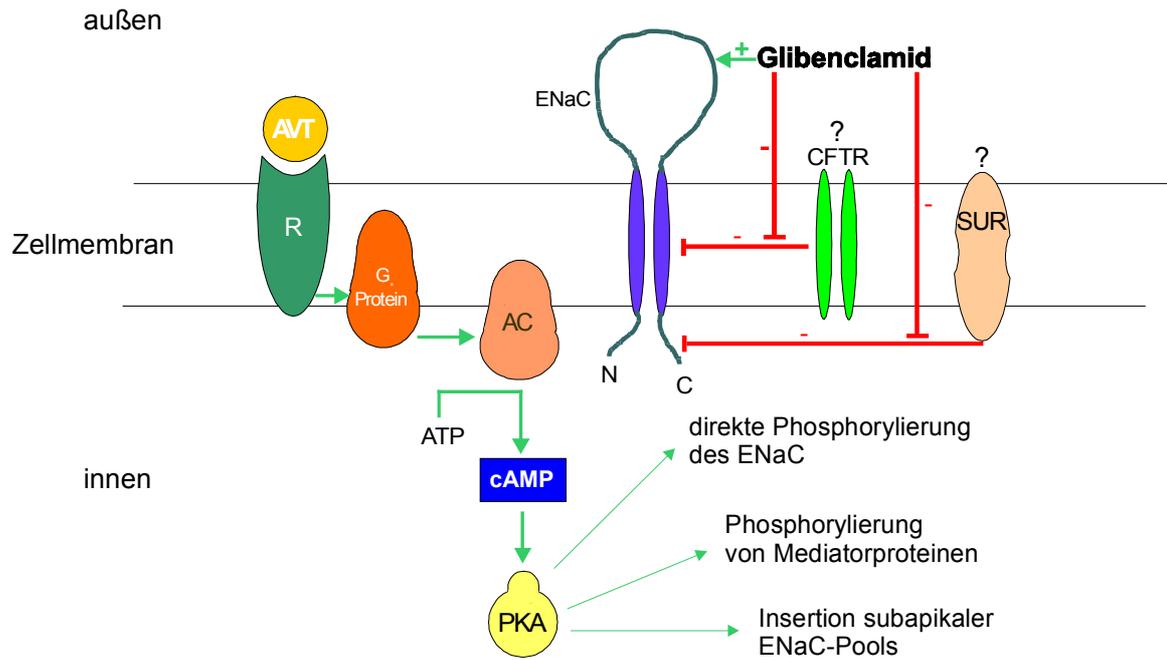
octamerer Struktur (Bryan et al., 1999). Dieser K_{ATP} Kanal aus den SUR1/Kir 6.2 – Untereinheiten existiert auch in Neuronen und neuroendokrinen Zellen (Bryan et al., 1999). Weder SUR1 noch Kir 6.2 generieren funktionelle Ströme wenn sie alleine in *Xenopus* Oocyten exprimiert werden (Gribble et al., 1997). Erst die Coexpression der beiden Bestandteile führte zu Strömen, die für native K_{ATP} Kanäle der β -Zellen charakteristisch sind (Inagaki et al., 1995, Sakura et al., 1995). Demnach sind sowohl der SUR als auch Kir für eine funktionelle Kanalaktivität nötig. Neben ATP hemmen auch Sulfonylharnstoffe den K_{ATP} -Kanal (Gribble et al., 1997). Studien mit Tritium-markiertem Glibenclamid belegen, dass MgATP die Bindung von Glibenclamid an seinen Rezeptor verringert (Bernardi et al., 1992, Gopalakrishnan et al., 1991, Niki et al., 1991, Schwanstecher et al., 1991, Schwanstecher et al., 1992). Versuche mit verändertem pH-Wert der Badlösung lassen darauf schließen, dass es die undissoziierte Form von Glibenclamid ist, welche mit dem SUR interagiert (Zünkler et al., 1989). Tatsächlich ist es die unionisierte Form der schwachen Säure Glibenclamid, die als lipidlöslicher Ligand des SUR in die Biomembran eindringen kann (Findlay et al., 1992). Allerdings sprechen andere Beobachtungen dafür, dass die Glibenclamid-Bindungsstelle extrazellulär lokalisiert sein könnte (Ashcroft et al., 1992). So deutet die Existenz eines endogenen Peptid-Liganden des SUR darauf, dass Glibenclamid seinen Rezeptor vom extrazellulären Milieu aus erreicht. Bei diesen Peptiden handelt es sich um sogenannte „Endosulfine“, endogene Modulatoren des SUR (Ashcroft et al., 1992). Als natürliche Liganden des SUR sind Endosulfine in der Lage, Glibenclamid zu verdrängen und die Insulinfreisetzung, vermutlich über den gleichen Mechanismus, den die Sulfonylharnstoffe auslösen (Ashcroft et al., 1992), anzuregen (Virsovy-Vergine et al., 1992).

Chraibi et al. (1999) vertreten die Hypothese, dass der ENaC durch ein assoziiertes ABC-Protein, wie dem CFTR oder dem SUR, reguliert werden kann. Wie Untersuchungen von Konstas et al. (2001) zeigen, verringerte die Coexpression von SUR1 und ENaC in *Xenopus* Oocyten den Amilorid-sensitiven Na^+ -Strom um 53 %, verglichen mit I_{ami} von Oocyten, die den ENaC alleine exprimierten. Diese Beeinträchtigung des Amilorid-sensitiven Na^+ -Stroms war

sogar auch dann zu beobachten, wenn der SUR1 mit einem ENaC exprimiert wurde, dessen Untereinheiten verkürzte C-Termini besaßen, eine Ursache für das Little's Syndrom. Demnach sind die C-Termini der ENaC-Untereinheiten nicht essentiell für die hemmende Wirkung des SUR1. Auch die Coexpression des ENaC mit SUR2B, einem niedrig affinen Sulfonylharnstoffrezeptor, der beispielsweise im Gehirn, Colon, Herz und in der Niere, Leber und Skelettmuskulatur vorkommt (Tanemoto et al., 2000), reduzierte I_{ami} um fast die Hälfte. Konstas und seine Mitarbeiter (2001) nehmen an, dass der SUR den Amilorid-sensitiven Strom durch Reduzierung der ENaC-Oberflächenexpression hemmt.

In den Sammelrohrzellen der Niere ist der SUR wahrscheinlich mit dem ENaC colokalisiert (Beesley et al., 1999). In *Xenopus* Oocyten wurde die Glibenclamid-Sensitivität durch den SUR2B auf den renalen K^+ -Kanal ROMK2 übertragen (Tanemoto et al., 2000). Demnach ist es durchaus denkbar, dass der SUR für die Glibenclamid-Sensitivität des in Oocyten exprimierten $gp\alpha\beta\gamma$ -ENaC verantwortlich ist. Da Ergebnisse existieren, die eine Hemmung des ENaC neben dem CFTR auch durch das ABC-Protein SUR belegen, könnte eine Hemmung des SUR durch Glibenclamid (Al-Awqati et al., 1995) zu einer Aktivierung des $gp\alpha\beta\gamma$ -ENaC führen. Allerdings ist bislang ungeklärt, ob der SUR in nativen Oocyten vorkommt. So führte die Applikation von Glibenclamid in nativen Oocyten zu keiner Veränderung des Klemmstroms.

Weiterhin ist auch eine direkte Wirkung von Glibenclamid auf den $gp\alpha\beta\gamma$ -ENaC vorstellbar. Dass der Glibenclamideffekt auf den ENaC in Oocyten kein Artefakt des Expressionssystems ist, belegt die Aktivierung des ENaC in A6-Zellen durch den gleichen Mechanismus (Chraibi et al., 1999). Die von Chraibi durchgeführten Patch-Clamp-Untersuchungen (1999) deuten darauf, dass die Glibenclamidwirkung lokal stattfindet. Das heißt, entweder ist der ENaC selbst das direkte Ziel oder ein anderes Protein, welches nah genug mit dem Kanal assoziiert ist, um in demselben Membranfleck von $1 \mu m^2$ zu sein, stellt das Ziel der Glibenclamidwirkung dar. Das Modell in **Abb. 26** zeigt abschließend die drei möglichen Angriffspunkte von Glibenclamid in dem durchgeführten Experiment.



- AC: Adenylatcyclase
- ATP: Adenosintriphosphat
- AVT: Arginin-Vasotocin
- cAMP: cyclisches Adenosin – 3', 5' - Monophosphat
- CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
- PKA: Proteinkinase A
- R: Hormonrezeptor
- SUR: Sulfonylharnstoffrezeptor

Abb. 26: Modell zur Regulation der $gp\alpha\beta\gamma$ -ENaC Chimäre durch AVT, cAMP und Glibenclamid

5. Zusammenfassung

Der epitheliale Na^+ -Kanal (ENaC) besteht aus homologen Untereinheiten, die mit α , β und γ bezeichnet werden. Die aus dem Meerschweinchencolon klonierte α -Untereinheit ($\text{gp}\alpha$) wurde mit der β - und γ -Untereinheit des *Xenopus*-ENaC ($\text{x}\beta\gamma$ -ENaC) in *Xenopus laevis* Oocyten coexprimiert. Dieser Hybridkanal ($\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC) wurde mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp -Methode untersucht.

Dosis-Wirkungs-Kurven mit dem spezifischen Blocker Amilorid lieferten für den vorliegenden $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC einen k_i -Wert, der in sehr guter Übereinstimmung mit den Daten steht, die von anderen klonierten ENaCs berichtet werden. Somit zeigt der $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC ein für hochaffine ENaCs typisches pharmakologisches Profil.

Während der Ratten-ENaC (rENaC) – generierte Na^+ -Strom in Oocyten gar nicht durch cAMP aktivierbar ist, und sich der xENaC – vermittelte Na^+ -Strom durch cAMP-Applikation nur um 79 % erhöhte, zeigten $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC exprimierende Oocyten nach Perfusion mit cAMP eine Zunahme des Amilorid-sensitiven Natriumstroms (I_{ami}) um durchschnittlich 530 %. Folglich muss die $\text{gp}\alpha$ -Untereinheit für die hohe cAMP-Sensitivität verantwortlich sein. Der schnelle Anstieg des Na^+ -Stroms und das Ausmaß der Stimulation lassen vermuten, dass sowohl bereits in der Zellmembran vorhandene ENaCs aktiviert als auch neue Kanäle eingebaut wurden. Experimente mit Arginin-Vasotocin belegen, dass dieses Peptidhormon hier als first messenger fungieren kann und somit die beobachtete cAMP-Aktivierung des Na^+ -Stroms erklärt.

Neben cAMP konnte auch Glibenclamid spezifisch den I_{ami} $\text{gp}\alpha\text{x}\beta\gamma$ -ENaC exprimierender Oocyten signifikant steigern. Diese Aktivierung um durchschnittlich 117 % war unabhängig von cAMP. Da es sich um additive Effekte der beiden Substanzen handelte, liegen offenbar verschiedene Signaltransduktionswege vor. Untersuchungen an Oocyten, die eine α -Chimäre aus Ratten – und Meerschweinchen-ENaC mit $\text{x}\beta\gamma$ -ENaC exprimierten, zeigten dann eine verminderte Glibenclamid-Sensitivität, wenn die extrazelluläre Schleife des α -ENaC von der Ratte stammte. Dies lässt darauf schließen, dass der extrazelluläre Anteil des Kanals Angriffsort der Glibenclamidwirkung ist. Neben dem ENaC als

direktem Ziel für Glibenclamid lässt sich eine Inhibierung des eventuell in *Xenopus* Oocyten vorkommenden Sulfonylharnstoffrezeptors nicht ausschließen.

Die vorliegenden Ergebnisse beweisen, dass der $g\text{p}\alpha\text{x}\beta\gamma\text{-ENaC}$ – vermittelte Na^+ -Strom in *Xenopus* Oocyten signifikant durch cAMP und Glibenclamid erhöht wird. Künftige Forschungen werden zeigen, auf welchem Regulationsweg cAMP und Glibenclamid diesen Effekt bewirken.

5. Summary

The epithelial sodium channel (ENaC) is a heterotetrameric protein which consists of homologous 2α -, 1β - and 1γ - subunits. The cRNA encoding the α -subunit of guinea-pig colon ENaC ($gp\alpha$ -ENaC) was coinjected with cRNA encoding the β - and γ -subunits of *Xenopus* ENaC ($x\beta\gamma$ -ENaC) into *Xenopus laevis* oocytes. This hybrid channel was investigated by employing two microelectrode-voltage-clamp technique.

In order to determine whether $gp\alpha x\beta\gamma$ -ENaC possesses a pharmacological profile known from other ENaCs, oocytes expressing this hybrid channel were perfused with increasing concentrations of amiloride. A Michaelis-Menten-fit gave a half-maximal blocker concentration of 130 nM. This k_i -value stands in good accordance with the k_i -values reported for other ENaCs.

Whereas the cloned ENaC from rat colon (rENaC), expressed in *Xenopus* oocytes is not sensitive to cAMP, the amiloride-sensitive Na^+ -current (I_{ami}) of $gp\alpha x\beta\gamma$ -ENaC expressing oocytes was stimulated by membrane permeant cAMP about 530 %. Since I_{ami} of $xENaC$ expressing oocytes only increased about 79 % due to the application of cAMP, the cAMP-sensitivity must be conferred on the other cloned ENaCs by the $gp\alpha$ -subunit. The rapid increase of the sodium current and the extent of the stimulation indicates that cAMP, as second messenger, caused an activation of ENaCs previously silent in the membrane, as well as an additional insertion of new channels into the membrane. Experiments conducted with arginine-vasotocin (AVT) showed that this peptide-hormone can work as a primary messenger for the cAMP-mediated increase of the Na^+ current.

The treatment of oocytes expressing $gp\alpha x\beta\gamma$ -ENaC with glibenclamide elevated I_{ami} about 117 %. In contrast, the amiloride-sensitive Na^+ -current of $r\alpha x\beta\gamma$ -ENaC expressing oocytes, only increased about 17 % due to the perfusion with glibenclamide. These data demonstrate that replacement of the $gp\alpha$ -subunit with the $r\alpha$ -subunit is sufficient to eliminate the stimulatory effect of glibenclamide. Since the perfusion of oocytes expressing $gp\alpha x\beta\gamma$ -ENaC with cAMP, following a

prestimulation by glibenclamide, additionally increased I_{ami} , the effect of glibenclamide seems to be independent of the cAMP-mediated pathway. In order to characterize the glibenclamide-sensitive component of $gp\alpha$ -ENaC, chimeras were constructed by swapping N- or C-terminal intracellular domains between $gp\alpha$ - and $r\alpha$ - subunits. These mutants were coexpressed with $x\beta\gamma$ -ENaC. All chimeras which possessed the extracellular loop of $r\alpha$ -ENaC exhibited a significantly smaller activation from glibenclamide. This indicates that the extracellular component of the $gp\alpha$ -subunit is responsible for sensitivity to glibenclamide. Besides the channel protein as the direct target for glibenclamide, an inhibition of a possible sulfonylureareceptor in oocytes cannot be excluded. The data clearly demonstrate that $gp\alpha x\beta\gamma$ -ENaC generated Na^+ -current is significantly activated by cAMP and glibenclamide.

6. Literaturverzeichnis

Abriel, H., Horisberger, J.-D. (1999 a)

Feedback inhibition of rat amiloride-sensitive epithelial sodium channels

expressed in *Xenopus laevis* oocytes

J. Physiol. 516, 31-43

Abriel, H., Loffing, J., Rebhun, J.F., Pratt, J.H., Schild, L., Horisberger, J.-D., Rotin, D., Staub, O. (1999 b)

Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome

J. Clin. Invest. 103, 667-673

Adams, C.M., Anderson, M.G., Motto, D.G., Price, M.P., Johnson, W.A., Welsh, M.J. (1998)

Ripped pocket and pickpocket, novel *Drosophila* DEG/ENaC subunits expressed in early development and in mechanosensory neurons

J. Cell Biol. 140, 143-152

Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement, J.P., Boyd, A.E., Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., Nelson, D.A. (1995)

Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion

Science 268, 423-426

Ahn, Y.N., Brooker, D.R., Kosari, F., Harte, B.J., Li, J., Mackler, S.A., Kleyman, T.R. (1999)

Cloning and functional expression of the mouse epithelial sodium channel

Am. J. Physiol. 277, F121-F129

Al-Awqati, Q. (1995)

Regulation of ion channels by ABC transporters that secrete ATP

Science 269, 805-806

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1995)
Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage
VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo
- Almeida, A.J., Burg, M.B. (1982)
Sodium transport in the rabbit connecting tubule
Am. J. Physiol. 243, C8842-C847
- Alvarez de la Rosa, D, Canessa, C.M., Fyfe, G.K., Zhang, P. (2000)
Structure and regulation of Amiloride-sensitive sodium channels
Annu. Rev. Physiol. 62, 573-594
- Ashcroft, S.J.H., Ashcroft, F.M. (1992)
The sulfonylurea receptor
Biochim. Biophys. Acta 1175, 45-59
- Awayda, M.S., Ismailov, I.I., Berdiev, B.K., Fuller, C.M., Benos, D.J. (1997)
Regulation of a cloned epithelial Na⁺ channel
J. Gen. Physiol. 108, 49-65
- Barbry, P., Lazdunski, M. (1996)
Structure and regulation of the Amiloride-sensitive epithelial sodium channel
in: Ion channels (Hrsg. Narahashi, T.), Vol. 4, chapter 4, Plenum Press, New York
- Bassiliana, F., Champigny, G., Waldmann, R., de Weille, J.R., Heurteaux, C., Lazdunski, M. (1997)
The acid-sensitive ionic channel subunit ASIC and the mammalian degenerin MDEG form a heteromultimeric H⁺-gated Na⁺ channel with novel properties
J. Biol. Chem. 273: 30204-30207
- Beesley, A.H., Qureshi, I.Z., Giesberts, A.N., Parker, A.J., White, S.J. (1999)
Expression of sulfonylurea receptor protein in mouse kidney
Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol. 439, 1-7

Benos, D.J., Cunningham, S., Baker, R.R., Beason, K.B., Oh, Y., Smith, P.R. (1992)

Molecular characteristics of amiloride-sensitive sodium channels
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 120, 31-113

Benos, D.J., Awayda, M.S., Ismailov, I.I., Johnson, J.P. (1995)

Structure and function of Amiloride-sensitive Na⁺ channels
J. Membr. Biol. 143, 1-18

Benos, D.J., Stanton, B.A. (1999)

Functional domains within the degenerin / epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels
J. Physiol. 520.3, 631-644

Berdiev, B.K., Prat, A.G., Cantiello, H.F., Ausiello, D.A., Fuller, C.M., Jovov, B., Benos, D.J., Ismailov, I.I. (1996)

Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments
J. Biol. Chem. 271, 17704-17710

Bernardi, H., Fosset, M., Lazdunski, M. (1992)

ATP/ADP binding sites are present in the sulfonylurea binding protein associated with brain ATP-sensitive K⁺ channels
Biochem. 31, 6328-6332

Biwersi, J., Emans, N., Verkman, A.S. (1996)

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activation stimulates endosome fusion in vivo
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12484-12489

Bonny, O., Hummler, E. (2000)

Dysfunction of epithelial sodium transport: from human to mouse
Kidney Int. 57, 1313-1318

- Bossi, E., Centinaio, A., Moriondo, A., Peres, A. (1998)
Ca²⁺-dependence of the depolarization-inducible Na⁺ current of *Xenopus* oocytes
J. Cell Physiol. 174, 154-159
- Boucher, R.C., Gatzky, J.T. (1983)
Characteristics of sodium transport by excised rabbit trachea
J. Appl. Physiol. 55, 1877-1883
- Bradbury, N.A., Jilling, T., Gabor, B., Sorscher, E.J., Bridges, R.J., Kirk, K.L. (1992)
Regulation of plasma membrane recycling by CFTR
Science 256, 530-531
- Briel, M, Greger, R., Kunzelmann, K. (1998)
Cl⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of the epithelial Na⁺ channels (ENaCs) in *Xenopus* oocytes co-expressing CFTR and ENaC
J. Physiol. 508, 825-836
- Brown, A.L. (1970)
The African Clawed Toad *Xenopus laevis*
Butterworths, London
- Bryan, J., Aguilar-Bryan, L. (1999)
Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K⁺ channels
Biochim. Biophys. Acta 1461, 285-303
- Burckhardt, B.C., Burckhardt, G. (1997)
NH⁴⁺ conductance in *Xenopus laevis* oocytes. I. Basic observations
Pflügers. Arch. – Eur. J. Physiol. 434, 306-312

Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J.D., Rossier, B.C. (1994 a)

Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits
Nature 367, 463-467

Canessa, C.M., Merillat, A.-M., Rossier, B.C. (1994 b)

Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells
Am. J. Physiol. 267, C1682-C1690

Chabot, H., Vives, M.F., Dagenais, A., Grygorczyk, C., Berthiaume, Y., Grygorczyk, R. (1999)

Downregulation of epithelial sodium channel (ENaC) by CFTR co-expressed in *Xenopus* oocytes is independent of Cl⁻ conductance
J. Membr. Biol. 169, 175-188

Chalfie, M., Driscoll, M., Huang, M. (1993)

Degenerin similarities
Nature 361, 504

Chalfant, M.L., Denton, J.S., Berdiev, B.K., Ismailov, I.I., Benos, D.J., Stanton, B.A. (1999 a)

Intracellular H⁺ regulates the α -subunit of ENaC, the epithelial Na⁺ channel
Am. J. Physiol. 276, C477-C486

Chalfant, M.L., Denton, J.S., Karlson, K.H., Stanton, B.A. (1999 b)

The N-terminus of the α -subunit of the epithelial sodium channel (ENaC) regulates its stability in the plasma membrane
FASEB J. 13, A66

Chang, S.S., Grunder, S., Hanukoglu, A., Rosler, A., Mathew, P.M., Hanukoglu, I., Schild, L., Lu, Y., Shimkets, R.A., Nelson-Williams, C. Rossier, B.C., Lifton, R.P. (1996)

Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1
Nat. Genet. 12, 248-253

Charpentier, G., Behue, N., Fournier, F. (1995)

Phospholipase C activates proteinkinase C during induction of slow Na⁺ current in *Xenopus* oocytes
Pflügers. Arch. – Eur. J. Physiol. 429, 825-831

Charpentier, G., Kado, R.T. (1999)

Induction of Na⁺ channel voltage sensitivity in *Xenopus* oocytes depends on Ca²⁺ mobilization
J. Cell. Physiol. 178, 258-266

Chraibi, A., Vallet, V., Firsov, D., Kharoubi Hess, S., Horisberger, J.-D. (1998)

Protease modulation of the activity of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes
J. Gen. Physiol. 111, 127-138

Chraibi, A., Horisberger, J.-D. (1999)

Stimulation of epithelial sodium channel activity by the sulfonylurea glibenclamide
J. Pharmacol. Exp. Ther. 290, 341-347

Clauss, W., Dürr, J.E., Guth, D., Skadhauge, E. (1987)

Effects of adrenal steroids on Na-transport in lower intestine (coprodeum) of the hen
J. Membr. Biol. 96, 141-152

Cougnon, M., Bouyer, P., Hulin, P., Anagnostopoulos, T., Planelles, G. (1996)
Further investigation of ionic diffusive properties and of NH_4^+ pathways in *Xenopus laevis* oocyte cell membrane
Pflügers. Arch. – Eur. J. Physiol. 431, 658-667

Dagenais, A., Kothary, R., Berthiane, Y. (1997)
The alpha subunit of the epithelial sodium channel in the mouse: Developmental regulation of its expression
Pediat. Res. 42, 327-334

Dascal, N. (1987)
The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels
CRC Crit. Rev. Biol. Chem. 22, 317-387

Daudin, E.M. (1802)
Histoire Naturelle des Rainettes, des Grenouilles et des Crapauds
Lerrault, Paris

de With, N.D., Sloostra, J.W., van der Schors, R.C. (1988)
The bioelectrical activity of the body wall of the pulmonate freshwater snail *Lymnaea stagnalis*: effects of neurotransmitters and the sodium influx stimulating neuropeptides
Gen. Comp. Endocrin. 70, 216-223

Dinudom, A.P., Young, J.A., Cook, D.I. (1993)
 Na^+ and Cl^- conductances are controlled by cytosolic Cl^- concentration in the intralobular duct cells of mouse mandibular glands
J. Membr. Biol. 135, 2389-295

Dinudom, A.P., Harvey, K.F., Komwatana, P., Young, J.A., Kumar, S., Cook, D.I. (1998)
Nedd4 mediates control of an epithelial Na^+ channel in salivary duct cells by cytosolic Na^+
Proc. Natl. Sci. USA 95, 7169-7173

Djelidi, S., Fay, M., Cluzeaud, F., Escoubet, B., Eugene, E., Capurro, C., Bonvalet, J.-P., Farman, N., Blot-Chabaud (1997)

Transcriptional regulation of sodium transport by vasopressin in renal cells
J. Biol. Chem. 272, 32919-32924

Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R. (1998)

The structure of the potassium channel: Molecular basis of K⁺ conduction and selectivity
Science 280, 69-77

Duellman, W.E., Trueb, L. (1994)

Biology of Amphibians

The Johns Hopkins University Press, Baltimore, London

Dumont, J.N. (1972)

Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin)

J. Morphol. 136, 153-180

Dumont, J.N., Brummett A.R. (1978)

Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin)

5. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues
J. Morphol. 155, 73-98

Ecke, D, Bleich, M., Greger, R. (1996)

The amiloride inhibitable Na⁺ conductance of rat colonic crypt cells is suppressed by forskolin

Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol. 431, 984-986

Eckert, R., Randall, D., Burggren, W., French, K. (2000)

Tierphysiologie, 3. Auflage

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Els, W.J., Helman, S.I. (1989)

Regulation of sodium channel densities by vasopressin signalling

Cell. Signal. 1, 533-539

Findlay, I. (1992)

Effects on pH upon the inhibition by sulfonylurea drugs of ATP-sensitive channels in cardiac muscle

J. Pharmacol. Exp. Ther. 262, 71-79

Firsov, D., Schild, L., Gautschi, I., Merillat, A.M., Schneeberger, E., Rossier, B.C. (1996)

Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach

Proc. Natl. Acad. Sci USA 93, 15370-15375

Firsov, D., Gautschi, I., Merillat, A.M., Rossier, B.C., Schild, L. (1998)

The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC)

EMBO J. 17, 344-352

Firsov, D., Robert-Nicoud, M., Gruender, S., Schild, L., Rossier, B.C. (1999)

Mutational analysis of cysteine-rich domains of the epithelial sodium channel (ENaC)

J. Biol. Chem. 274, 2743-2749

Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (Hrsg.), (1993)

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 6. Auflage

BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich

Frindt, G., Windhager, E.E. (1990)

Ca²⁺-dependent inhibition of sodium transport in rabbit cortical collecting tubules

Am. J. Physiol. 258, F568-F582

- Frindt, G., Silver, R.B., Windhager, E.E., Palmer, L.G. (1995)
Feedback regulation of Na channels in rat CCD. III. Response to cAMP
Am. J. Physiol. 268, F480-F489
- Frings, S., Purves, R.D., Macknight, A.D.C. (1988)
Single channel recordings from the apical membrane of the toad urinary bladder epithelial cell
J. Membr. Biol. 106, 157-172
- Fuller, C.M., Awayda, M.S., Arrate, M.P., Bradford, A.L., Morris, R.G., Canessa, C.M., Rossier, B.C. (1995)
Cloning of a bovine renal epithelial Na⁺ channel
Am. J. Physiol. 269, C641-654
- Fyfe, G.K., Canessa, C.M. (1998)
Subunit composition determines the single channel kinetics of the epithelial sodium channel
J. Gen. Physiol. 112, 423-432
- Garbers, D.L., Dubois, S.K. (1999)
The molecular basis of hypertension
Annu. Rev. Biochem. 68, 127-155
- Garcia-Anoveros, J., Derfler, B., Neville-Golden, J., Hyman, B.T., Corey, D.P. (1997)
BnaC1 and BnaC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1459-1464
- Garty, H., Benos, D.J. (1988)
Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel
Physiol. Rev. 68, 309-373

Garty, H., Palmer, L.G., (1997)

Epithelial sodium channels: Function, structure and regulation

Physiol. Rev. 77, 359-396

Garty, H. (2000)

Regulation of the epithelial Na⁺ channel by aldosterone: open questions and emerging answers

Kidney Int. 57, 1270-1276

Goldin, A.L. (1992)

Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection

Meth. Enzymol. 207, 266-279

Goldstein, O., Asher, C., Garty, H. (1997)

Cloning and induction by low NaCl intake of avian intestine Na⁺ channel subunits

Am. J. Physiol. 41, C270-C277

Gopalakrishnan, M., Johnson, D.E., Janis, R.A., Triggle, D. J. (1991)

Characterization of binding of the ATP-sensitive potassium channel ligand

[3H]glyburide, to neuronal and muscle preparations

J. Pharmacol. Exp. Ther. 257, 1162-1171

Green, K.A., Falconer, S.W.P., Cottrell, G.A. (1994)

The neuropeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide) directly gates two ion channels in an identified helix neuron

Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol. 428, 232-240

Gribble, F.M., Ashfield, R., Ämmälä, C., Ashcroft, F.M. (1997)

Properties of cloned ATP-sensitive K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes

J. Physiol. 498, 87-98

Grimm, H. (1952)

Beobachtungen über Bewegungsnormen, Ernährung und Fortpflanzungsverhalten des Krallenfrosches

Z. Tierphys. 9, 230-244

Grunder, S., Firsov, D., Chang, S.S., Jaeger, N.F., Gautschi, I., Schild, L., Lifton, R.P., Rossier, B.C. (1997)

A mutation causing pseudohypoaldosteronism type 1 identifies a conserved glycine that is involved in the gating of the epithelial sodium channel

EMBO J. 16, 899-907

Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R., Marbaix, G. (1971)

Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells

Nature 233, 177-182

Hamilton, K.L., Eaton, D.C. (1985)

Single-channel recordings from amiloride-sensitive epithelial sodium channel

Am. J. Physiol. 249, C200-C207

Hanke, W. (Hrsg.)

Biology and physiology of amphibians (1990)

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

Hanke, W., Hanke, R. (1997)

Methoden der Membranphysiologie

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Harvey, K.F., Dinudom, A., Komwatana, P., Jolliffe, C.N., Day, M.L., Parasivam, G., Cook, D.I., Kumar, S. (1999)

All three WW domains of murine Nedd4 are involved in the regulation of the epithelial sodium channels by intracellular Na⁺

J. Biol. Chem. 274, 12525-12530

Haubrich, R. (1961)

Hierarchical behaviour in the South African clawed frog *Xenopus laevis* Daudin

Anim. Behav. 9, 71-76

Helman, S.I., Cox, T.C., van Driessche, W. (1983)

Hormonal control of apical membrane Na⁺ transport in epithelia

J. Gen. Physiol. 82, 201-220

Herder-Lexikon der Biologie (1994)

Sauermost, R. (Hrsg.)

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Heusser, H.R. (1993)

Niedere Froschlurche. In: Grzimek, B. (Hrsg.), Grzimeks Tierleben Bd. 5

Deutscher Taschenbuchverlag, München

Higgins, J.T., Gupta, S. (1988)

Response of toad urinary bladder to vasopressin analogs possessing V₁ or V₂ specificity

Membrane Biophysics III: Biological Transport, 93-101 (Hrsg. Dinno, M.A., Armstrong, W. McD.)

Alan R. Liss, Inc. New York

Hilken, G., Iglauer, F., Richter, H.-P. (1997)

Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Labortier

Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., Katz, B. (1952)

Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*

J.Physiol. 116, 424-448

Horisberger, J.-D., Rossier, B.C. (1992)

Aldosterone regulation of gene transcription leading to control of ion transport

Hypertension 19, 221-227

- Hug, T., Koslowsky, T., Ecke, D., Greger, R., Kunzelmann, K. (1995)
Actin-dependent activation of ion conductances in bronchial epithelial cells
Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol. 429, 682-690
- Hummler, E. (1999)
Implication of ENaC in salt-sensitive hypertension
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69, 385-390
- Inagaki, N, Gonoi, T., Clement, J.P.IV, Namba, N. Inazawa, J., Gonzalez, G.,
Aguilar-Bryan, L., Seino, S., Bryan, J. (1995)
Reconstitution of IK_{ATP} : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor
Science 270, 1166-1170
- Ismailov, I.I., Mc Duffie, J.H., Benos, D.J. (1994)
Protein kinase A phosphorylation and G protein regulation of purified renal Na^+
channels in planar bilayer membranes
J. Biol. Chem. 269, 10235-10241
- Ismailov, I.I., Awayda, M.S., Jovov, B., Berdiev, B.K., Fuller, C.M., Dedman, J.R.,
Kaetzel, M.A., Benos, D.J. (1996)
Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane
conductance regulator
J. Biol. Chem. 271, 4725-4732
- Ismailov, I.I., Kieber-Emmons, T., Lin, C., Berdiev, B.K., Shlyonsky, V.G., Patton,
H.K., Fuller, C.M., Worrell, R., Zuckerman, J.B., Sun, W., Eaton, D.C., Benos,
D.J., Kleyman, T.R. (1997)
Identification of an amiloride binding domain within the alpha subunit of the
epithelial Na^+ channel
J. Biol. Chem. 272, 21075-21083

Ismailov, I.I., Berdiev, B.K., Shlyonki, V.G., Fuller, C.M., Prat, A.G., Jovov, B., Cantiello, H.F., Ausiello, D.A., Benos, D.J. (1997)

Role of actin in regulation of epithelial sodium channels by CFTR

Am. J. Physiol. 272, C1077-C1086

Ji, H.-L., Chalfant, M.L., Jovov, B., Lockhart, J.P., Parker, S.B., Fuller, C.M., Stanton, B.A., Benos, D.J. (2000)

The cytosolic termini of the β - and γ - ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel

J. Biol. Chem. 275, 27947-27956

Jiang, Q., Mak, D., Devidas, S., Schwiebert, E.M., Bragin, A., Zhang, Y., Skach, W.R., Guggino, W.B., Foskett, J.K., Engelhardt, J.F. (1998)

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP release is controlled by a chloride sensor

J. Cell Biol. 143, 645-657

Kellenberger, S., Gautschi, I., Schild, L. (1999)

A single point mutation in the pore region of the epithelial Na⁺ channel changes ion selectivity by modifying molecular sieving

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96,4170-4175

Kemp, B.E., Parker, M.W., Hu, S., Tiganis, T., House, C. (1994)

Substrate and pseudosubstrate interactions with protein kinases: determinants of specificity

Trends Biochem. Sci. 19, 441-448

Kieber-Emmons, T., Lin, C., Foster, M.H., Kleyman, T.R. (1999)

Antiidiotypic antibody recognizes an amiloride binding domain within the α subunit of the epithelial Na⁺ channel

J. Biol. Chem. 274, 9648-9655

Kleyman, T.R., Cragoe, E.J. (1988)

Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport

J. Membr. Biol. 15, 145-151

Kleyman, T.R., Ernst, S.A., Coupaye-Gerard, B. (1994)

Arginine vasopressin and forskolin regulate apical cell surface expression of epithelial Na⁺ channels in A6 cells

Am. J. Physiol. 266, F506-F511

Kleyman, T.R., Sheng, S., Kosari, F., Kieber-Emmons, T. (1999)

Mechanism of action of amiloride: a molecular perspective

Semin. Nephrol. 19, 524-532

Knowles, M., Murray, G., Shallal, J., Askin, F., Ranga, V., Gatzky, J., Boucher, R. (1984)

Bioelectric properties and ion flow across excised human bronchi

J. Appl. Physiol. 56, 868-877

Kokko, K.E., Matsumoto, P.S., Ling, B.N., Eaton, D.C. (1994)

Effects of prostaglandin E₂ on amiloride-blockable Na⁺ channels in a distal nephron cell line (A6)

Am. J. Physiol. 267, C1414-C1425

Konstas, A.-A., Bielfeld-Ackermann, A., Korbmacher, C. (2001)

Sulfonylurea receptors inhibit the epithelial sodium channel (ENaC) by reducing surface expression

Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol. DOI 10.1007/s 004240100597 (in press)

Krafte, D.S., Volberg, J. (1992)

Properties of endogenous voltage-dependent sodium currents in *Xenopus laevis* oocytes

J. Neurosci. Methods 43, 189-193

Krattenmacher, R., Fischer, H., van Driessche, W., Clauss, W. (1988)

Noise analysis of cAMP-stimulated Na⁺ current in frog colon

Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol. 412, 568-573

Kunzelmann, K., Kiser, G., Schreiber, R., Riordan, J.R. (1997)

Inhibition of epithelial sodium currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

FEBS Lett. 400, 341-344

Kunzelmann, K., Schreiber, R., Nitschke, R., Mall, M (2000)

Control of epithelial Na⁺ conductance by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol. 440, 193-201

Langloh, A.L.B., Berdiev, B., Ji, H.-L., Keyser, K., Stanton, B.A., Benos, D.J.

(2000)

Charged residues in the M2 region of α -hENaC play a role in channel conductance

Am. J. Physiol. 278, C277-C291

Letz, B., Korbmacher, C. (1997)

cAMP stimulates CFTR-like Cl⁻ channels and inhibits amiloride-sensitive Na⁺ channels in mouse CCD cells

Am. J. Physiol. 272, C657-C666

Li, J.H.-Y., Palmer, L.G, Edelman, I.S., Lindemann, B. (1982)

The role of sodium channel density in the natriuretic response of the toad urinary bladder to an antidiuretic hormone

J. Membr. Biol. 64, 77-89

Liebold, K.M., Reifarth, F.W., Clauss, W., Weber, W.-M. (1996)

cAMP-activation of amiloride-sensitive Na⁺ channels from guinea-pig colon expressed in *Xenopus* oocytes

Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol. 431, 913-922

- Lingueglia, E., Voilley, N., Waldmann, R., Lazdunski, M., Barbry, P. (1993)
Expression cloning of an epithelial amiloride-sensitive Na⁺ channel – a new
channel type with homologies to *Caenorhabditis elegans* degenerins
FEBS Letters 318, 95-99
- Lingueglia, E., Champigny, G., Lazdunski, M., Barbry, P. (1995)
Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel
Nature 378, 730-733
- Lukacs, G.L., Segal, G., Kartner, N., Grinstein, S., Zhang, F. (1997)
Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein
phosphorylation
Biochem. J. 328, 353-361
- MacDonald, F.J., Price, M.P., Snyder, P.M., Welsh, M.J. (1995)
Cloning and expression of the beta and gamma subunits of the human epithelial
sodium channel
Am. J. Physiol. 268, C1157-C1163
- Mall, M., Hipper, A., Greger, R., Kunzelmann, K. (1996)
Wild-type but not deltaF508 CFTR inhibits Na⁺ conductance when expressed in
Xenopus oocytes
FEBS Lett. 381, 47-52
- Mall, M., Bleich, M., Greger, R., Schreiber, R., Kunzelmann, K. (1998)
The amiloride inhibitable Na⁺ conductance is reduced by CFTR in normal but not
in CF airways
J. Clin. Invest. 102, 15-21
- Mall, M., Bleich, M., Kühr, J., Brandis, M., Greger, R., Kunzelmann, K. (1998)
CFTR-mediated inhibition of amiloride sensitive sodium conductance by CFTR in
human colon is defective in cystic fibrosis
Am. J. Physiol. 277, G709-G716

Mano, I, Driscoll, M. (1999)

DEG/ENaC channels: a touchy superfamily that watches its salt

BioEssays 21, 568-578

Marunaka, Y., Eaton, D.C. (1991)

Effects of vasopressin and cAMP on single amiloride-blockable Na channels

Am. J. Physiol. 260, C1071-C1084

McNicholas, C.M., Guggino, W.B., Schwiebert, E.M., Hebert, S.C., Giebisch, G., Egan, M.E. (1996)

Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8083-8088

McNicholas, C.M., Canessa, C.M. (1997)

Diversity of channels generated by different combinations of epithelial sodium channel subunits

J. Gen. Physiol. 109, 681-692

Morris, R.G., Tousson, A., Benos, D.J., Schafer, J.A. (1998)

Microtubule disruption inhibits AVT-stimulated Cl⁻ secretion but not Na⁺ reabsorption

Am. J. Physiol. 274, F300-F314

Mourre, C., Widmann, C., Lazdunski, M. (1990)

Sulfonylurea binding sites associated with ATP-regulated K⁺ channels in central nervous system: autoradiographic analysis of their distribution and ontogenesis, and of their localization in mutant mice cerebellum

Brain Res. 519, 9-43

Naren, A.P., Nelson, D.J., Xie, W., Jovov, B., Pevsner, J., Bennett, M.K., Benos, D.J., Quick, M.W., Kirk, K.L. (1997)

Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc 18 isoforms
Nature 390, 302-305

Niki, I., Nicks, J.L., Ashcroft, S.J.H. (1990)

The beta-cell glibenclamide receptor is an ADP-binding protein
Biochem. J. 268, 713-718

Niki, I., Ashcroft, S.J.H. (1991)

Possible involvement of protein phosphorylation in the regulation of the sulfonylurea receptor of a pancreatic beta-cell line, HIT T15
Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res. 1133, 95-101

Oh, Y.S., Smith, P.R., Bradford, A.L., Keeton, D., Benos, D.J. (1993)

Regulation by phosphorylation of purified epithelial Na channels in planar lipid bilayers
Am. J. Physiol. 265, C85-C91

Ohara, A., Matsunaga, H., Eaton, D.C. (1993)

G protein activation inhibits amiloride-blockable highly selective sodium channels in A6 cells
Am. J. Physiol. 264, C352-C360

Palmer, L.G. (1982)

Ion selectivity of the apical membrane Na⁺ channel in the toad urinary bladder
J. Membr. Biol. 67, 91-98

Palmer, L.G., Lorenzen, M. (1983)

Antidiuretic hormone-dependent membrane capacitance and water permeability in the toad urinary bladder
Am. J. Physiol. 244, F195-F204

Palmer, L.G. (1984)

Voltage-dependent block by amiloride and other monovalent cations of apical Na⁺ channels in the toad urinary bladder

J. Membr. Biol. 80, 153-165

Palmer, L.G., Speez, N. (1984)

Modulation of antidiuretic hormone-dependent capacitance and water flow in toad urinary bladder

Am. J. Physiol. 246, F501-F508

Palmer, L.G., Andersen, O.S. (1989)

Interactions of amiloride and small monovalent cations with the epithelial sodium channel. Inferences about the nature of the channel pore

Biophys. J. 55, 779-787

Palmer, L.G. (1991)

The epithelial Na⁺ channel: inferences about the nature of the conducting pore

Comments Mol. Cell. Biophys. 7, 259-283

Parker, I, Miledi, R. (1987)

Tetrodotoxin-sensitive sodium current in native *Xenopus* oocytes

Proc. R. Soc. London B232, 289-296

Penzlin, H. (1991)

Lehrbuch der Tierphysiologie, 5. Auflage

Gustav Fischer Verlag, Jena

Pradervand, S., Barker, P.M., Wang, Q., Ernst, S.A., Beermann, F., Grubb, B.R.,

Burnier, M., Schmidt, A., Bindels, R.J.M., Gatzky, J.T., Rossier, B.C., Hummler, E.

(1998)

Salt restriction induces pseudohypoaldosteronism type 1 in mice expressing low levels of the β -subunit of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 1732-1737

- Prat, A.G., Bertorelle, A.M., Ausiello, D.A., Cantiello, H.F. (1993)
Activation of epithelial Na⁺ channels by protein kinase A requires actin filaments
J. Physiol. (London) 265, C224-C233
- Prat, A.G., Xiao, Y.-F., Ausiello, D.A., Cantiello, H.F. (1995)
cAMP independent regulation of CFTR by the actin cytoskeleton
Am. J. Physiol. 268, C1552-C1561
- Price, M.P, Snyder, P.M., Welsh, M.J. (1996)
Cloning and expression of a novel human brain Na⁺ channel
J. Biol. Chem. 271, 7879-7882
- Puoti, A., May, A., Canessa, C.M., Horisberger, J.-D., Schild, L., Rossier, B.C.
(1995)
The highly selective low-conductance epithelial Na⁺ channel of *Xenopus laevis* A6
kidney cells
Am. J. Physiol. 38, C188-C197
- Quinton, P.M. (1981)
Effects of some ion transport inhibitors on secretion and reabsorption in intact and
perfused single human sweat glands
Pflügers. Arch. – Eur. J. Physiol. 391, 309-313
- Riestenpatt, S., Zeiske, W., Onken, H. (1994)
Cyclic AMP stimulation of electrogenic uptake of Na⁺ and Cl⁻ across the gill
epithelium of the chinese crab *Eriocheir sinensis*
J. Exp. Biol. 188, 159-174
- Rossier, B.C., Palmer, L.G. (1992)
Mechanisms of aldosterone action on sodium and potassium transport
The Kidney: Physiology and Pathophysiology (Hrsg. Seldin, D. W., Giebisch, G.)
Raven, New York, Vol. 1, 1373-1409

Sakura, H., Ämmälä, C., Smith, P.A., Gribble, F.M., Ashcroft, F.M. (1995)
Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic β -cells, brain, heart and skeletal muscle

FEBS Lett. 377, 338-344

Schafer, J.A., Troutman, S.L. (1990)

cAMP mediates the increase in apical membrane Na^+ conductance produced in the rat CCD by vasopressin

Am. J. Physiol. 259, F823-F831

Schaffert, S. (1999)

Regulation der klonierten α -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals aus dem Meerschweinchencolon

Diplomarbeit im Fachbereich Biologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

Schild, L., Schneeberger, E., Gautschi, I., Firsov, D. (1997)

Identification of amino acid residues in the α , β and γ subunits of the epithelial sodium channel (ENaC) involved in amiloride block and ion permeation

J. Gen. Physiol. 109, 15-26

Schnizler, M., Mastroberardino, L., Weber, W.-M., Verrey, F., Clauss, W. (2000)

cAMP sensitivity conferred to the epithelial Na^+ channel by α -subunit cloned from guinea pig colon

Pflügers. Arch. – Eur. J. Physiol. 439, 579-587

Schreiber, R., Hopf, A., Mall, M., Greger, R., Kunzelmann, K. (1999)

The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na^+ channel

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 5310-5315

Schultz, B.D., Deroos A.D.G., Venglarik, C.J., Singh, A.K., Frizzel, R.A., Bridges, R.J. (1996)

Glibenclamide blockade of CFTR chloride channels

Am. J. Physiol. 271, L192-L200

Schwanstecher, M., Löser, S., Rietze, I., Panten, U. (1991)

Phosphate and thiophosphate group donating adenine and guanine nucleotides inhibit glibenclamide binding to membranes from pancreatic islets

Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 343, 83-89

Schwanstecher, M., Schaupp, U., Löser, S., Panten, U. (1992)

The binding properties of the particulate and solubilized sulfonylurea receptor from cerebral cortex are modulated by the Mg^{2+} complex of ATP

J. Neurochem. 59, 1325-1335

Schwiebert, E.M., Benos, D.J., Fuller, C.M. (1998)

Cystic fibrosis: a multiple exocrinopathy caused by dysfunction in a multifunctional transport protein

Am. J. Med. 104, 576-590

Shareghi, G.R., Stoner, L.C. (1978)

Calcium transport across segments of rabbit nephron in vitro

Am. J. Physiol. 235, F 367-F375

Sheppard, D.N., Robinson, K.A. (1997)

Mechanism of glibenclamide inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl^- channels expressed in a murine cell line

J. Physiol. (Lond.) 503, 333-346

Shimkets, R.A., Lifton, R.P., Canessa, C.M. (1997)

The activity of the epithelial sodium channel is regulated by clathrin-mediated endocytosis

J. Biol. Chem. 272, 25537-25541

Shimkets, R.A., Lifton, R., Canessa, C.M. (1998)

In vivo phosphorylation of the epithelial sodium channel

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3301-3305

Short, D.B., Trotter, K.W., Reczek, D., Kreda, S.M., Bretscher, A., Boucher, R.C., Stutts, M.J., Milgram, S.L. (1998)

An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton

J. Biol. Chem. 273, 19797-19801

Sigel, E. (1990)

Use of *Xenopus* Oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins

J. Membr. Biol. 117, 201-221

Singer, S.J., Nicolson, G.L., (1972)

The fluid mosaic model of the structure of cell membranes

Science 175, 720-731

Skeer, J.M., et al. (1994)

Determination of the molecular mass of the native beta-cell sulfonylurea receptor

FEBS Lett. 338, 98

Snyder, P.M., Olson, D.R., Bucher, D. (1999)

A pore segment in DEG/ENaC Na⁺ channels

J. Biol. Chem. 274, 28484-28490

Spilmont, C., Hinnrasky, J., Zahm, J.M., Jacquot, J., Puchelle, E., Kuhry, J.G. (1996)

CFTR is involved in membrane endocytosis but not in fluid-phase and receptor-mediated endocytosis in human respiratory epithelial cells

Biochem. Biophys. Res. Commun. 227, 182-188

Stanton, B.A. (1989)

Characterization of apical and basolateral membrane conductances of rat inner medullary collecting duct

Am. J. Physiol. 256, F862-F868

Staub, O., Dho, S., Henry, P.C., Correa, J., Ishikawa, McGlade, J., Rotin, D. (1996)

WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome

EMBO J. 15, 2371-2380

Staub, O., Gautschi, Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L., Rotin, D. (1997)

Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination

EMBO J. 16, 6325-6336

Stetson, D.L., Lewis, S.A., Alles, W., Wade, J.B. (1982)

Evaluation by capacitance measurements of antidiuretic hormone-induced membrane area changes in toad bladder

Biochim. Biophys. Acta 689, 267-274

Storch, V., Welsch, U. (1993)

Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum, 21. Auflage

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

Storch, V., Welsch, U. (1994)

Kurzes Lehrbuch der Zoologie, 7. Auflage

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

Stühmer, W. (1998)

Electrophysiological recordings from *Xenopus* oocytes

Method. Enzymol. 293, 280-299, Academic Press

Stutts, M.J., Canessa, C.M., Olsen, J.C., Hamrick, M., Cohn, J.A., Rossier, B.C., Boucher, R.C. (1995)

CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels
Science 269, 847-850

Stutts, M.J., Rossier, B.C., Boucher, R.C. (1997)

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inverts protein kinase A-mediated regulation of epithelial sodium channel kinetics
J. Biol. Chem. 272, 14037-14040

Takahashi, A., Watkins, S.C., Howard, M., Frizzel, R.A. (1996)

CFTR-dependent membrane insertion is linked to stimulation of the CFTR Cl⁻ channel
Am. J. Physiol. 271, C1887-C1894

Tanemoto, M., Vanoye, C.G., Dong, K., Welch, R., Abe, T., Hebert, S.C., Xu, J.Z. (2000)

Rat homolog of sulfonamide receptor 2B determines glibenclamide sensitivity of ROMK2 in *Xenopus laevis* oocyte
Am. J. Physiol. 278, F659-F666

Taylor, M., Johnson, A., Smith, D. (1985)

Growing *Xenopus* oocytes have spare translational capacity
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82, 6586-6589

Vallet, V., Chraïbi, A., Gaeggeler, H.-P., Horridberger, J.-D., Rossier, B. C. (1998)

An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel
Nature 389, 607-610

van Driessche, W., Lindemann, B. (1979)

Concentration dependence of currents through single sodium-selective pores in frog skin
Nature 282, 519-520

van Driessche, W., Aelvoet, I., Eriij, D. (1987)

Oxytocin and cAMP stimulate monovalent cation movements through a Ca^{2+} -sensitive, amiloride-insensitive channel in the apical membrane of toad urinary bladder

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 313-317

van Driessche, W. Eriij, D. (1991)

Cyclic AMP increases electrical capacitance of apical membrane of toad urinary bladder

Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys. 99, 409-411

Verrey, F., Digicaylioglu, M., Bolliger, U. (1993)

Polarized membrane movements in A6 kidney cells are regulated by aldosterone and vasopressin/vasotocin

J. Membr. Biol. 133,213-226

Verrey, F (1995)

Transcriptional control of sodium transport in tight epithelia by adrenal steroids

J. Membr. Biol. 144, 93-110

Virsolvy-Vergine, A., Leray, H., Kuroki, S., Lupo, B., Dufour, M., Bataille, D. (1992)

Endosulfine, an endogenous peptidic ligand for the sulfonylurea receptor: purification and partial characterization from ovine brain

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6629-6633

Volk, K.A., Husted, R.F., Snyder, P.M., Stokes, J.B. (2000)

Kinase regulation of hENaC mediated through a region in the COOH-terminal portion of the α -subunit

Am. J. Physiol. 278, C1047-C1054

Wager, V.A. (1965)

The frogs of South Africa

Purcell & Sons, Capetown

- Waldmann, R., Champigny, G., Voilley, N., Lauritzen, I., Lazdunski, M. (1996)
The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*
J. Biol. Chem. 271, 10433-10436
- Waldmann, R., Champigny, G., Bassiliana, F., Heurteaux, C, Lazdunski, M. (1997)
A proton-gated cation channel involved in acid-sensing
Nature 386, 173-177
- Wang, S. Raab, R.W., Schatz, P.J., Guggino, W.B., Li, M. (1998)
Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)
FEBS Lett. 427, 103-108
- Warncke, J., Lindemann, B. (1985)
Voltage dependence of Na⁺ channel blockage by amiloride: relaxation effects in admittance spectra
J. Membr. Biol. 86, 255-265
- Warnock, D.G. (1999)
Hypertension
Semin. Nephrol. 19, 374-380
- Weber, W.-M., Dannenmaier, B., Clauss, W. (1993)
Ion transport across leech integument
Comp. Physiol. B 163, 153-159
- Weber, W.-M., Liebold, K.M., Clauss, W. (1995)
Amiloride-sensitive Na⁺ conductance in native *Xenopus* oocytes
Biochim. Biophys. Acta 1239, 201-206
- Weber, W.-M. (1999)
Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art (Review)
Biochim. Biophys. Acta 1421: 213-233

- Will, P.C., Cortright, R.N., Delisle, C., Douglas, J.G., Hopfer, U. (1985)
Regulation of amiloride-sensitive electrogenic sodium transport in the rat colon by steroid hormones
Am. J. Physiol. 248, G124-G132
- Wu, M., Gerhart, J. (1991)
Raising *Xenopus* in the laboratory
Method. Cell Biol. 36, 3-18
- Zasloff, M. (1987)
Mangainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation , characterisation of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor
Proc. Nat. Acad. Sci. 84, 5449-5453
- Zeiske, W., Onken, H., Schwarz, H.-J., Graszynski, K. (1992)
Invertebrate epithelial Na⁺ channels: amiloride-induced current-noise in crab gill
Biochim. Biophys. Acta 1105, 245-252
- Züнкler, B.J., Trube, G., Panten, U. (1989)
How do sulfonylureas approach their receptor in the B-cell plasma membrane?
Naunyn Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol. 340, 328-332

7. Anhang

Tab. 7.1: Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADH	Antidiuretisches Hormon
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AVP	Arginin Vasopressin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAP	channel activating protease
cAMP	cyclisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cm	Zentimeter
cpt-cAMP	8-(4-chlorophenylthio)-cAMP
cRNA	komplementäre RNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
et al.	und Mitarbeiter
gpENaC	Epithelialer Natriumkanal des Meerschweinchencolons
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
I	Strom
I _{ami}	Amilorid-sensitiver Strom
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
I _m	transmembranärer Gesamtstrom
IV-Kurve	Strom-Spannungskurve
KCl	Kaliumchlorid
k _i	halbmaximale Blockerkonzentration
KuIORi	Kultur-Oocyten-Ringer
M	Mol
M1 + M2	transmembranäre Domänen

MDCK	Madin-Darby canine kidney
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	messenger RNA
N	Anzahl der Versuchstiere
n	Anzahl der Messungen
nA	Nanoampere
NaCl	Natriumchlorid
Nedd 4	Neuronal precursor cells expressed develop. down-regulated
nl	Nanoliter
NMDG	N-Methyl-D-glucamin
ORi	Oocyten-Ringer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PKA	Proteinkinase A
PKC	Ca ²⁺ -abhängige Proteinkinase
R	Widerstand
rENaC	Epithelialer Natriumkanal des Rattencolons
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TMA-Cl	Tetramethylammoniumchlorid
U	Spannung
U	Units
V _a	Potenzial des extrazellulären Raumes
V _i	Potenzial des intrazellulären Raumes
xENaC	Epithelialer Natriumkanal des <i>Xenopus</i> ' (A6-Nierenzelllinie)
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
z.B.	zum Beispiel

7.2 Bezugsquelle der eingesetzten Geräte

Tab. 7.2: Geräte für Voltage-Clamp-Messungen

Gerät	Typ und Bezugsquelle
AD/DA-Wandler CED 1401	Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK
Binokular	Carl Zeiss und Leitz, Wetzlar
Computer	CAT 486/66
Digitalvoltmeter	M-3650B Voltcraft
Gleichstromquelle	Typ 1733, Westfalica Technica
Laser-Elektrodenziehgerät	P-2000, Sutter Instrument Co., USA
Low Pass Filter	902 LPF 2, Frequency Devices, USA
Mikromanipulatoren	ST 2-0, Bachofer, Reutlingen
Mikroelektrodenhalter	PSW, Warner Instrument Corp., USA
Oocyten-Injektor	Nanoject Variable Injector, Drummond Scientific Co., Broomall, USA
Oocyten-Klemmverstärker	OC-725A, Warner Instrument Corp., Hamden, USA
Oocytenbrutschrank	ICE 400, Memmert, Schwalbach
Oszillograph	HM-205-3, Hameg, Frankfurt
Puller für Injektionskapillaren	PA-81, Bachofer, Reutlingen
Vakuumpumpe	KNF, Freiburg
Zweikanal-Flachbettschreiber	BD 112 Kipp & Zonen, Bachofer, Reutlingen

7.3 Verwendete Chemikalien

Tab. 7.3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
[Arg ⁸]-Vasotocin	Sigma
Amilorid	Sigma
8-(4-Chlorophenylthio)cAMP	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Collagenase	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva
Glibenclamid	Sigma
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumhydroxid	Merck
Mineralöl	Sigma
N-Methyl-D-Glucamin (NMDG)	Fluka
Natriumchlorid	Fluka
Natriumhydroxid	Merck
Penicillin G	Sigma
Pyruvat	Fluka
Streptomycinsulfat	Sigma
Tetraethylammoniumchlorid (TMA-Cl)	Fluka

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Wolfgang Clauß für die Überlassung des Themas und Arbeitsplatzes.

Frau Sonja Schaffert für die engagierte Einarbeitung in die Voltage-Clamp-Technik, die Frosch-OP und das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Frau Dr. Ursula Eckstein-Ludwig für ihre Unterstützung bei allen fachlichen Fragen.

Herrn Andreas Berk für die gute Teamarbeit im Labor.

Herrn Jan-Hillern Behrendt, der die Fotos der *Xenopus* Oocyten anfertigte.

Allen Mitarbeitern des Institutes für die mir stets entgegengebrachte Unterstützung.

Herrn Prof. Petzinger für die Initiierung und Organisation des Graduiertenkollegs „Molekulare Veterinärmedizin“.

Allen Doktoranden des Graduiertenkollegs, deren Hilfsbereitschaft oft über das Fachliche hinausging.

Den am Graduiertenkolleg beteiligten Professoren und Dozenten für die Durchführung der Fortbildungsseminare und Praktika.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben.

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle Zitate und übernommenen Darstellungen wurden durch Quellenangaben kenntlich gemacht.

Gießen, August 2001

Martin Holler