

Aus dem Zentrum der Physiologie  
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Institut für Physiologie II (Nieren- und Membranphysiologie)  
Direktor: Prof. Dr. med. E. Frömter

**UNTERSUCHUNG AMILORID-SENSITIVER KATIONENSTRÖME**

**IN XENOPUS LAEVIS OOZYTEN:**

**ENDOGENER MTX-AKTIVIERTER KATIONENKANAL**

**UND EXOGENER EPITHELIALER NATRIUMKANAL**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereiches Humanmedizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Christine Range  
aus Kassel

Frankfurt am Main, 2000

---

Dekan: Prof. Dr. med. Gebhard von Jagow

Referent: Prof. Dr. med. Eberhard Frömter

Koreferent: Prof. Dr. Heinz Gögelein

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2000

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1995 bis November 1997 am Institut für Nieren- und Membranphysiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität durchgeführt.

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG Fr 233/9-1 und Ko 1057/7-1) unterstützt.

---

## Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
DCDPC	3'-5-Dichlorodiphenylamin-2-Carboxylsäure
DEPC H <sub>2</sub> O	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	halbmaximale Aktivierungskonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	epithelialer Natriumkanal mit $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Untereinheit
Gd <sup>3+</sup>	Gadolinium
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-Ethanschwefelsäure)
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Hemmkonzentration
K <sup>+</sup>	Kalium
Li <sup>+</sup>	Lithium
LOE 908	(RS)-(3,4-Dihydro-6,7-Dimethoxyisochinolin-1- $\gamma$ 1)-2-Phenyl-N,N-Di- [2-(2,3,4-Trimethoxyphenyl)-Ethyl]-Acetamid
M	mol/l
Mn <sup>2+</sup>	Mangan
MTX	Maitotoxin
Na <sup>+</sup>	Natrium
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
NMDG	N-Methyl-D-Glutamin
p	Signifikanz
PBS	Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffered saline solution</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
cRNA	<i>complementary</i> RNA, in vitro hergestellt
SEM	mittlerer Fehler des Mittelwerts ( <i>standard error mean</i> )
SK&F 96365	1-( $\beta$ -[3-(4-Methoxyphenyl)-Propoxy]-4-Methoxyphenethyl)-1H- Imidazol-Hydrochlorid



---

## INHALT

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>4</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>7</b>
NIERE: SALZ- UND WASSERHAUSHALT .....	7
DER EPITHELIALE NATRIUMKANAL (ENAC) .....	10
REGULATION VON ENAC .....	12
M-1 ZELLEN .....	13
OOZYTEN ALS EXPRESSIONSSYSTEM .....	15
ENDOGENE KANÄLE IN XENOPUS LAEVIS OOZYTEN .....	16
MAITOTOXIN UND OOZYTEN .....	18
ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT .....	19
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
GEWINNUNG DER OOZYTEN .....	20
ZELLKULTUR .....	20
PRÄPARATION DER M-1 POLY(A) <sup>+</sup> RNA .....	21
Extraktion der RNA .....	21
Präzipitation .....	22
Repräzipitation .....	22
Waschen .....	22
PRÄPARATION DER RENAC cRNA .....	22
VERSUCHSANORDNUNG UND DURCHFÜHRUNG .....	22
Injektionskammer .....	22
Kapillaren .....	23
Aufbau der Pumpe .....	23
Aufbau der gesamten Apparatur .....	23
Injektion der RNA .....	23
Die „Voltage-Clamp“-Technik .....	25
Geräte .....	27
Lösungen .....	27
Statistik .....	29
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
I. NICHTSELEKTIVE MTX-AKTIVIERTE KATIONENKANÄLE IN XENOPUS OOZYTEN .....	30
Ruhemembranpotential und stationäre Membranströme .....	30
Effekt von MTX .....	30
Konzentrationsabhängigkeit des MTX-induzierten Stroms .....	31
Selektivität für einwertige Kationen .....	33
Effekte zweiwertiger Kationen .....	34

Wirkung von Hemmstoffen .....	36
II. AMILORID-SENSITIVE EPITHELIALE NATRIUMKANÄLE .....	38
Expression des epithelialen Na <sup>+</sup> -Kanals der Ratte ( $\alpha\beta\gamma$ -rENaC) in <i>Xenopus laevis</i>	
Oozyten .....	38
Expression verschiedener Kombinationen von $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -rENaC .....	41
Vergleich von $\alpha\beta\gamma$ -rENaC mit Na <sup>+</sup> -Kanälen, die aus M-1 mRNA exprimiert	
wurden .....	41
Koexpressionsexperimente von M-1 mRNA und $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA .....	42
Koinjektion von $\beta$ - und $\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA .....	42
Hemmwirkung von Amilorid auf den aus M-1 mRNA und $\beta\gamma$ -rENaC cRNA	
zusammengesetzten ENaC .....	44
Selektivität des ENaC nach Injektion von M-1 mRNA und $\beta\gamma$ -rENaC cRNA .....	44
Koinjektion von M-1 mRNA mit $\alpha$ -, $\alpha\beta$ - oder $\alpha\gamma$ -rENaC cRNA .....	45
Koinjektion von cRNA aller drei rENaC Untereinheiten mit M-1 mRNA .....	47
<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
I. NICHTSELEKTIVE MTX-AKTIVIERTE KATIONENKANÄLE IN <i>XENOPUS LAEVIS</i> OOZYTEN .....	49
Welche nichtselektiven Kationenkanäle werden durch MTX in <i>Xenopus laevis</i>	
Oozyten aktiviert? .....	49
MTX stimuliert den Kalziumeinstrom .....	52
Mögliche Mechanismen der Kanalaktivierung durch MTX .....	54
Physiologische Bedeutung des MTX-aktivierten nichtselektiven Kationenkanals in	
<i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	55
II. AMILORID-SENSITIVE EPITHELIALE NATRIUMKANÄLE .....	56
Koexpression von M-1 mRNA und $\beta\gamma$ -rENaC cRNA in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten .....	57
Koexpression von M-1 mRNA mit $\beta\gamma$ -rENaC cRNA führt zu Ionenkanälen mit	
veränderten Eigenschaften gegenüber $\alpha\beta\gamma$ -ENaC .....	60
Kodiert M-1 mRNA für ein Protein, das $\alpha\beta\gamma$ -ENaC regulieren kann? .....	63
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>67</b>
<b>Literatur .....</b>	<b>70</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>84</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>85</b>

---

## Einleitung

### NIERE: SALZ- UND WASSERHAUSHALT

Das häufigste Kation im Extrazellulärraum ist  $\text{Na}^+$ . Es wird in Form von Kochsalz mit der Nahrung aufgenommen. Die Regulation seiner Aufnahme und Ausscheidung ist entscheidend für die Homöostase des Salz- und Wasserhaushaltes: Steigt der  $\text{Na}^+$ -Gehalt im Extrazellulärraum, so kommt es zur vermehrten Einlagerung von Wasser und somit zur Volumenzunahme des Extrazellulärraums (Ödembildung). Sinkt der  $\text{Na}^+$ -Gehalt, so nimmt das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen ab. Im Extremfall kann ein Kreislaufkollaps eintreten.

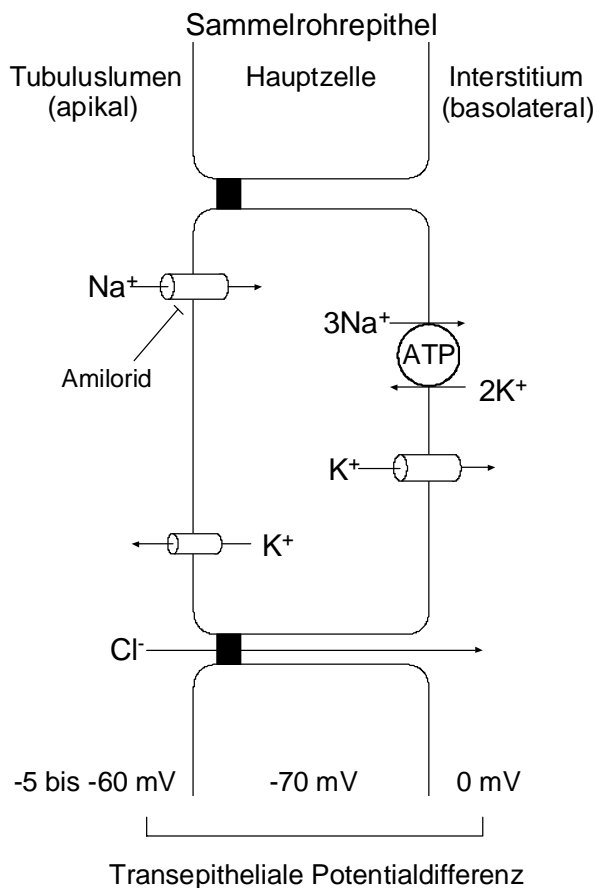
Um Entgleisungen im  $\text{Na}^+$ - und Wasserhaushalt zu verhindern, verfügt der Körper über ein komplexes Regelungssystem, das bisher nur in seinen Grundzügen aufgeklärt ist: Extrazellulärer Volumenmangel führt im Vas afferens des Nierenglomerulus zu einer Ausschüttung von Renin aus spezialisierten Zellen der Media. Renin katalysiert die Abspaltung von Angiotensin I von dem in der Leber gebildeten Angiotensinogen. Die Bildung von Angiotensin II aus Angiotensin I wird durch ACE (*Angiotensin converting enzyme*) katalysiert. Angiotensin II wirkt zum einen stark vasokonstriktorisch, zum anderen fördert es die Ausschüttung des Mineralokortikoids Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Aldosteron entfaltet seine Wirkung in der Niere vorwiegend im distalen Nephron, wo es die  $\text{Na}^+$ -Rückresorption aus dem Tubuluslumen sowie die  $\text{K}^+$ - und  $\text{H}^+$ -Ausscheidung in das Lumen steigert. Verschiebungen im  $\text{Na}^+$ - und Wasserhaushalt können sich auch in Veränderungen der Plasmaosmolalität niederschlagen. Eine Erhöhung der Plasmaosmolalität, deren physiologischer Wert bei 290 mosm/kg  $\text{H}_2\text{O}$  liegt, führt zur Erregung vorwiegend in der Leber und im Hypothalamus angesiedelter Osmorezeptoren und vermittelt dieser zur Ausschüttung des antidiuretischen Hormons (ADH) aus dem Hypothalamus und der Neurohypophyse. ADH wirkt ebenfalls am distalen Nephron und steigert die Wasserrückresorption aus dem Tubuluslumen. Die Osmorezeptoren stellen die empfindlichsten Auslöser der ADH-Ausschüttung dar. Des Weiteren existieren weniger empfindliche Volumenrezeptoren, hauptsächlich in den Herzvorhöfen, sowie Barorezeptoren im Aortenbogen und im Karotissinus, die bei stärkerem Volumen- bzw. Druckabfall im Kreislauf die Ausschüttung von ADH anregen. Weiterhin sind die oben erwähnten Volumenrezeptoren in den Vorhöfen Sensoren des einzigen bekannten Regulationssystems,

das entgegengesetzt zu den bisher aufgeführten volumenerhöhenden Hormonen wirkt: Bei einer Steigerung des extrazellulären Volumens wird entweder über nervale Impulse oder direkt über eine verstärkte Vorhofdehnung der atriale natriuretische Faktor (ANF) aus Vesikeln der Herzmuskelzellen freigesetzt. ANF steigert die glomeruläre Filtrationsrate und hemmt die  $\text{Na}^+$ -Resorption im Nephron.

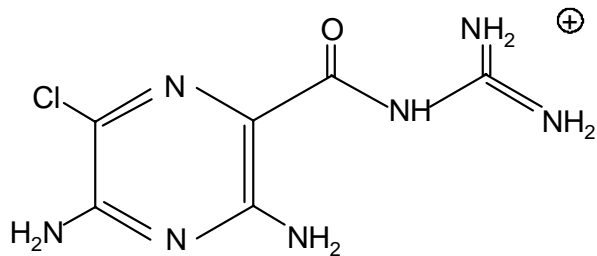
Aus dem vorangegangenen Abschnitt geht hervor, daß das distale Nephron der Hauptwirkungsort für die hormonelle Regulation des  $\text{Na}^+$ - und Wasserhaushaltes ist. Zwar werden im proximalen Anteil des Nephrons bereits 60-70 % des filtrierten Wassers und  $\text{Na}^+$  resorbiert, jedoch ist das Epithel in diesem Teil des Nephrons mit den relativ losen interzellulären Verbindungen nicht in der Lage, den Harn zu konzentrieren und so harnpflichtige Substanzen bei minimalem Wasserverlust anzureichern. Die Feinregulation der Resorption und Ausscheidung von Wasser und Elektrolyten obliegt dem dichten Epithel des kortikalen und medullären Sammelrohres, auf das im folgenden näher eingegangen wird.

Das Sammelrohrepithel besteht aus zwei Zellarten. Die am häufigsten vorkommenden Zellen, die Hauptzellen, resorbieren  $\text{Na}^+$  und sezernieren  $\text{K}^+$ . Die weniger häufigen Schaltzellen werden unterteilt in Typ A, der  $\text{H}^+$  sezerniert und  $\text{K}^+$  resorbieren kann, und Typ B, der  $\text{HCO}_3^-$  sezerniert.

Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung einer Hauptzelle aus dem Sammelrohr. Treibende Kraft aller Transportvorgänge im Sammelrohr ist die in der basolateralen Zellmembran gelegene  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase. Unter Energieverbrauch pumpt sie zwei  $\text{K}^+$ -Ionen in die Zelle hinein und drei  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle in die interstitielle Flüssigkeit hinaus. Dadurch bildet sich ein chemischer Gradient für  $\text{Na}^+$  mit niedriger intrazellulärer  $\text{Na}^+$ -Konzentration und ein umgekehrter chemischer Gradient für  $\text{K}^+$  mit hoher intrazellulärer Konzentration aus. Da die basolaterale Zellmembran eine hohe  $\text{K}^+$ -Permeabilität besitzt, führt die Rezirkulation der  $\text{K}^+$ -Ionen zur Entstehung eines Membranpotentials von ca. -70 mV (Zellinneres negativ gegen Interstitium). Dieses Membranpotential wird durch die Aktivität der rheogenen Pumpe noch verstärkt. Die niedrige intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration und das Zytoplasma-negative Membranpotential stellen einen hohen elektrochemischen Gradienten zwischen Sammelrohlumen und Zelle dar, der für die  $\text{Na}^+$ -



**Abb. 1** Modell einer Hauptzelle im kortikalen Sammelrohr



**Abb. 2** Amilorid: 3,5-diamino-N-(Amino-iminomethyl)-6-Chloropyrazincarboxamid, Strukturformel

Resorption genutzt werden kann. Sobald die Zelle  $\text{Na}^+$ -Kanäle in der apikalen Membran exprimiert oder aktiviert, können  $\text{Na}^+$ -Ionen vom Sammelrohlumen in die Zelle einströmen und dann durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe ins Interstitium weitertransportiert werden. Der  $\text{Na}^+$ -Ausstrom aus dem Tubuluslumen lässt das Lumen elektrisch negativ geladen zurück und treibt damit den Nachstrom von  $\text{Cl}^-$ -Ionen an, der aller Wahrscheinlichkeit nach überwiegend parazellulär erfolgt. Bei Öffnung von  $\text{K}^+$ -Kanälen in der apikalen Zellmembran können die Hauptzellen in Abhängigkeit vom elektrochemischen Potentialgefälle für  $\text{K}^+$ -Ionen auch  $\text{K}^+$  in das Sammelrohlumen sezernieren.

Bei den  $\text{Na}^+$ -Kanälen, die in der apikalen Zellmembran der Hauptzellen des Sammelrohres exprimiert werden, und deren Aktivität das Ausmaß der  $\text{Na}^+$ -Resorption vorrangig bestimmt, handelt es sich um den hochselektiven „epithelialen“  $\text{Na}^+$ -Kanal (ENaC), der durch das Diuretikum Amilorid (s. Abbildung 2) und seine Derivate Benzamil und Phenamil gehemmt werden kann. Die heute bekannten Eigenschaften dieses Ionenkanals werden nachfolgend zusammengefasst.

## DER EPITHELIALE NATRIUMKANAL (ENaC)

Der Amilorid-sensitive epitheliale  $\text{Na}^+$ -Kanal (ENaC) findet sich bei Säugetieren nicht nur im kortikalen und medullären Sammelrohr, sondern auch in anderen Epithelien, die an der Regulation des  $\text{Na}^+$ -Haushaltes beteiligt sind bzw. deren Funktion durch Aldosteron oder Glukokortikoide reguliert wird. Dazu gehören das distale Kolon, die Lungen, Schweiß- und Speicheldrüsen sowie die Geschmacksknospen der Papillen der Zunge. Bei Amphibien wird er auch in der Haut exprimiert [Garty & Palmer (1997)]. Charakteristische Eigenschaften, die den epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal auszeichnen, sind 1) seine hohe Selektivität für  $\text{Na}^+$  (sowie für  $\text{Li}^+$ ) bei fast vollständiger Undurchlässigkeit für  $\text{K}^+$  (das Verhältnis der  $\text{Na}^+$ - zur  $\text{K}^+$ -Permeabilität kann mehr als 1000:1 betragen [Palmer (1982)]), 2) seine geringe Einzelkanalleitfähigkeit von 4-5 pS, 3) seine vergleichsweise langsame Schaltkinetik mit mittleren Offen- und Geschlossenzeiten von mehr als einer Sekunde, sowie insbesondere 4) seine hohe Empfindlichkeit gegen Amilorid. Die mittlere Hemmkonzentration liegt charakteristischerweise im submikromolaren Bereich [Palmer (1992)].

Durch Expressionsklonierung gelang es im Jahr 1993 den beiden Arbeitsgruppen von Canessa et al. (1993) und Lingueglia et al. (1994) fast zeitgleich, die cDNA eines epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals aus dem Rattenkolon zu klonieren und in *Xenopus laevis* Oozyten zu exprimieren. Der Strom durch den exprimierten Kanal stimmte in seiner Selektivität und Blockierbarkeit weitgehend mit der Amilorid-sensitiven Stromkomponente des Original-epithels überein, war aber sehr klein. In weiteren Untersuchungen fanden Canessa et al. (1994) zwei weitere sehr ähnlich aufgebaute cDNA-Stränge und zeigten, daß erst die Koexpression der cRNA aller drei cDNA-Stränge zur Ausbildung des Vollbildes der epithelialen  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit in der Zellmembran der Oozyten führte. Die drei cDNA-Stränge werden mit  $\alpha$ -rENaC,  $\beta$ -rENaC und  $\gamma$ -rENaC bezeichnet, wobei „r“ für die Tierspezies (Ratte) steht. Jeder Strang enthält zwei transmembranäre Abschnitte und dazwischen einen großen extrazellulären Anteil, so daß sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende intrazellulär liegt. Mittlerweile wurden auch ENaC-Untereinheiten von verschiedenen Tierspezies kloniert, so existieren Klone aus dem Hühnerkolon (cENaC), einer renalen Zellkultur von *Xenopus laevis* (A6 Zellen, xENaC), aus der menschlichen Lunge, Niere und dem Kolon (hENaC), sowie vom Rind (bENaC) [Garty & Palmer (1997)]. Inzwischen wurde in menschlichen Geweben noch eine weitere Untereinheit,  $\delta$ -hENaC, isoliert. Diese Untereinheit findet sich im Gehirn, Pankreas, in den Testes und den Ova-

rien und wird dort anstelle von  $\alpha$ -ENaC gemeinsam mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC exprimiert [Waldmann et al. (1995)].

Seitdem wurden in zahlreichen Arbeiten die Eigenschaften dieses Ionenkanals näher charakterisiert sowie seine Regulationsmechanismen eingehend untersucht. Klinisch interessant ist dieser  $\text{Na}^+$ -Kanal dadurch, daß Mutationen zu mehreren seltenen erblichen Entgleisungen der Blutdruckregulation führen können. Das Liddle-Syndrom äußert sich in schwerer jugendlicher Hypertonie bei niedriger  $\text{K}^+$ -Konzentration im Plasma und metabolischer Alkalose, was dem Bild eines Hyperaldosteronismus entspricht, jedoch mit niedrigen Konzentrationen von Renin und Aldosteron im Plasma einhergeht. Inzwischen kennt man die genetische Ursache des Liddle-Syndroms. Es beruht auf einer Mutation am C-terminalen Ende der  $\beta$ - oder  $\gamma$ -ENaC Untereinheit [Hansson et al. (1995); Schild et al. (1995)], häufig mit Verkürzung dieses intrazellulär gelegenen Proteinendes. Folge dieser Mutation ist eine gesteigerte Amilorid-sensitive  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit, die hauptsächlich auf einer Zunahme der Kanaldichte in der Zellmembran beruht, gleichzeitig aber auch mit einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit des Ionenkanals einhergeht [Firsov et al. (1996)]. Inzwischen wurde festgestellt, daß die Verkürzung der  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Untereinheit am C-terminalen Ende zum Verlust eines prolinreichen Proteinabschnittes führt [Hansson et al. (1995)]. Dieser Abschnitt, auch PY-Motiv genannt, findet sich an allen drei Untereinheiten von ENaC. Er ist an der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit die Bindungsstelle für die Ubiquitin-Ligase Nedd4 [Staub et al. (1996)]. Nedd4 vermittelt die Ubiquitinierung von ENaC und leitet damit den Abbau des Kanalproteins ein [Staub et al. (1997); Abriel et al. (1999)]. Ausgelöst wird dieser Mechanismus durch hohe intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen [Harvey et al. (1999)]. Folglich beruht die beobachtete Aktivierung der Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit bei Liddle-Mutationen auf einem verminderten Abbau des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals.

Eine weitere Mutation von ENaC, die zu Blutdruckregulationsstörungen führt, erzeugt den Phänotyp des Pseudohypoaldosteronismus Typ I mit extensivem renalen Salzverlust und daraus resultierendem stark erniedrigten Blutdruck bei hyperkaliämischer Azidose. Ursache sind hier unterschiedliche Mutationen in der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheit von ENaC, die zu einer herabgesetzten Aktivität des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals führen [Lifton (1996)]. Für eine bekannte Mutation am N-terminalen Ende der  $\alpha$ -Untereinheit wurde eine Beein-

flussung der Schaltkinetik des Ionenkanals festgestellt mit stark verringerter Öffnungszeit und verlängerten Schließzeiten [Gründer et al. (1999)].

Außerdem ist ENaC vermutlich an dem Krankheitsbild der Mukoviszidose, auch cystische Fibrose (CF) genannt, beteiligt. Diese in Europa häufigste rezessiv vererbte Krankheit äußert sich unter anderem in einem ungewöhnlich zähen Bronchialsekret mit häufigen Atemwegsinfektionen. Dem liegt eine Mutation des *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR) zugrunde. CFTR ist ein cAMP-aktivierter Chloridkanal, der selbst eine regulierende Wirkung auf andere Ionenkanäle ausübt, z.B. auf ENaC über eine Nukleotid-bindende Domäne (NBD-1) [Schreiber et al. (1999)]. So bewirkt der aktivierte CFTR bei Kontrollpersonen eine Hemmung des ENaC im pulmonalen Epithel, was in einer verringerten Na<sup>+</sup>-Resorption bei gesteigerter Cl<sup>-</sup>-Sekretion in den Alveolarraum resultiert. Dies führt den osmotischen Gesetzen zufolge zum Nachströmen von Wasser und somit zur Verdünnung des Bronchialsekretes. Bei CF-Kranken fehlt dagegen der CFTR-Kanal, oder er ist nicht aktiv, womit auch seine inhibitorische Wirkung auf ENaC entfällt. Dies führt zu einer gesteigerten Na<sup>+</sup>-Resorption bei fehlender Cl<sup>-</sup>-Sekretion ins Alveolar- respektive Bronchiallumen. Als Folge davon wird das Bronchialsekret eingedickt und zähflüssig [Mall et al. (1998)].

## REGULATION VON ENaC

In der Niere wird der epitheliale Na<sup>+</sup>-Kanal hauptsächlich durch Aldosteron und zusätzlich vermutlich auch durch ADH reguliert. ADH bindet an Rezeptoren in der basolateralen Zellmembran und stimuliert dadurch die Adenylatzyklase. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, und innerhalb von 5-20 Minuten werden neben Wasserkanälen (Aquaporin 2) wahrscheinlich auch Na<sup>+</sup>-Kanäle in die apikale Zellmembran eingebaut [Garty & Palmer (1997)].

Aldosteron passiert die Zellmembran, bindet an intrazelluläre Rezeptoren und führt über eine Steigerung der Transkription im Zellkern zu einer gesteigerten Proteinsynthese. Dabei kann man einen frühen und einen späten Effekt unterscheiden. Während der ca. 3-24h nach Aldosterongabe auftretende späte Effekt auf einer verstärkten Transkription und Translation der ENaC Untereinheiten beruht, werden in der Frühphase der Aldosteronwirkung (0,5-3h nach Aldosterongabe) bereits bestehende Kanaluntereinheiten ver-



stärkt in die Membran eingebaut. Dabei nimmt man an, daß Aldosteron zunächst die Transkription eines oder mehrerer ENaC-regulierender Proteine fördert, die den Einbau präexistenter ENaC Untereinheiten in die Zellmembran vermitteln [Verrey (1999)]. Bisher sind zwei solcher Proteine gefunden worden, deren Expression durch Aldosteron gesteigert wird: K-Ras2A [Spindler et al. (1997)], ein kleines G-Protein, und die Serum-Glukokortikoid-Kinase sgk [Chen et al. (1999)]. Die Koexpression dieser Proteine mit ENaC in *Xenopus laevis* Oozyten führt zu einer Erhöhung des Amilorid-sensitiven Stroms auf ein Vielfaches [Mastroberardino et al. (1998); Chen et al. (1999)]. Ob diese regulierenden Proteine direkt oder indirekt durch Aldosteron induziert werden und ob sie ihre Wirkung an ENaC über Vermittler ausüben, ist noch nicht geklärt. Allerdings wurde eine Phosphorylierung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC Untereinheiten nach Aldosterongabe in vivo nachgewiesen [Shimkets et al. (1998)], was für die direkte Wirkung am Kanal spräche. Offenbar ist die Aldosteronwirkung aber nicht in allen Geweben gleich. So wird in der Niere eher die Transkription der  $\alpha$ -rENaC Untereinheit stimuliert, während der Bestand an  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC mRNA konstant bleibt. Im Kolon hingegen werden  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC verstärkt transkribiert, während der Bestand an  $\alpha$ -ENaC mRNA gleich bleibt [Asher et al. (1996)]. Außerdem haben Glukokortikoide und Insulin einen stimulierenden Einfluß auf ENaC.

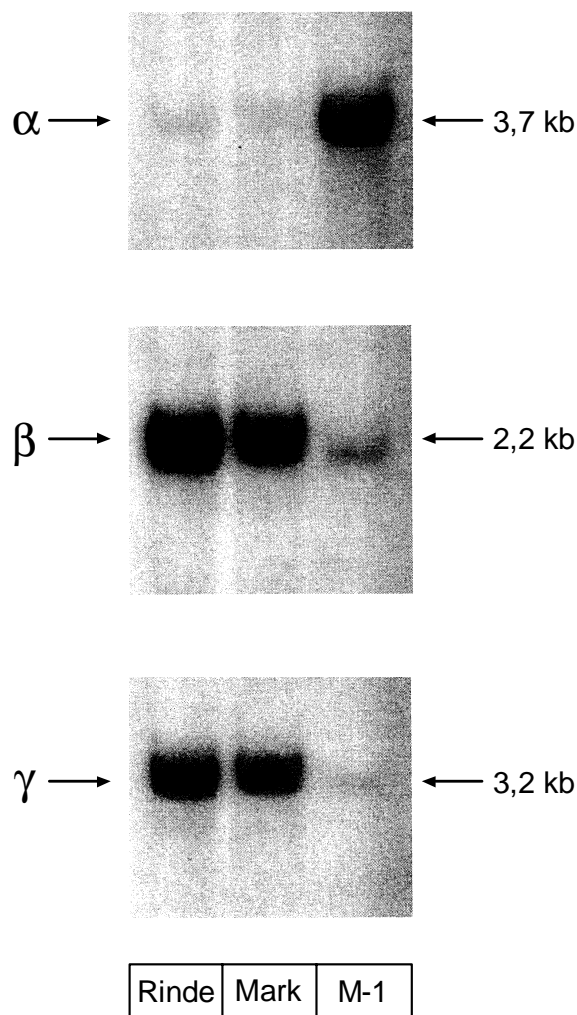
Neben der hormonellen Regelung der epithelialen  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit gibt es auch lokale Regelungsvorgänge, die innerhalb einer Zelle ablaufen. So ist bekannt, daß Erhöhung der extrazellulären und der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration sowie der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und Erniedrigung des intrazellulären pH die epitheliale  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit inhibieren, eine Hyperpolarisation der apikalen Zellmembran die Leitfähigkeit erhöht [Garty & Palmer (1997)]. Schließlich wurde zunächst in A6 Zellen, einer epithelialen Zellreihe aus der Niere von *Xenopus laevis*, später auch in einer Zellreihe aus dem kortikalen Sammelrohr von Mäusen, eine Serinprotease (CAP1) beobachtet, die in Koexpression mit ENaC den Amilorid-sensitiven Einwärtsstrom um das Zwei- bis Dreifache erhöht [Vallet et al. (1997); Vuagniaux et al. (2000)].

## **M-1 ZELLEN**

Ein geeignetes Untersuchungsmodell für Expressionsstudien an epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanälen stellt die M-1 Zelllinie dar. Es handelt sich hierbei um eine Zelllinie aus dem kortikalen Sammelrohr einer für die Anfangsregion des Simian Virus (SV)40 transgenen Maus

[Stoos et al. (1991)]. Über bisher unvollständig geklärte Mechanismen führt die veränderte genetische Ausstattung der SV40 transgenen Mäuse zu einer verstärkten Proliferationsneigung der Zellen bei erhaltener Differenzierungsfähigkeit [MacKay et al. (1988)]. So zeigen M-1 Zellen in Kultur zum einen die typische Morphologie von Hauptzellen aus dem kortikalen Sammelrohr mit Mikrovilli und einem zentralen Zilium und bilden polare Epithelien mit Schlußleisten im apikalen Bereich, zum anderen unterhalten sie einen transepithelialen Salz- und Wassertransport, und zeigen die für das kortikale Sammelrohr charakteristische Amilorid-sensitive  $\text{Na}^+$ -Absorption [Stoos et al. (1991); Korbmaier et al. (1993)].

Die *Northern Blot* Analyse von M-1 mRNA zeigte, daß der epitheliale  $\text{Na}^+$ -Kanal (ENaC) in diesen Zellen exprimiert wird. Dabei bildet die  $\alpha$ -ENaC Untereinheit eine kräftige Bande, während die Banden der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC Untereinheit weniger deutlich ausgeprägt sind. Proben aus der nativen Rattenniere zeigten sowohl im Mark als auch in der Rinde



**Abb. 3** *Northern Blot* Analyse von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC in der Nierenrinde und im Nierenmark der Ratte sowie in konfluenten M-1 Zellen. Die Gesamtlänge der für die einzelnen Untereinheiten verwendeten rENaC cDNA Proben ist am rechten Rand angegeben. Für alle drei Hybridisierungen wurde derselbe RNA-Blot verwendet. Die mit  $\alpha$ - oder  $\beta$ -rENaC cDNA hybridisierten Blots (obere und mittlere Abbildung) wurden einen Tag inkubiert. Der mit  $\gamma$ -rENaC cDNA hybridisierte Blot (untere Abbildung) wurde 10 Tage inkubiert. (nach Letz et al. (1995))

kräftigere Banden für die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -ENaC Untereinheit als für die  $\alpha$ -ENaC Untereinheit [Letz et al. (1995)] (s. Abbildung 3). In *Patch-Clamp*-Untersuchungen wurde gezeigt, daß ENaC in die apikale Zellmembran eingebaut wird. So konnten Letz et al. Einzelkanäle mit den charakteristischen Eigenschaften beobachten: einer niedrigen Leitfähigkeit, langen Offen- und Geschlossenzeiten, einer hohen Selektivität für  $\text{Na}^+$  gegenüber  $\text{K}^+$  sowie einer hohen Sensitivität gegenüber Amilorid [Letz et al. (1995)].

Die scheinbar überproportionale Expression von  $\alpha$ -ENaC mRNA gegenüber  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC mRNA in M-1 Zellen läßt die Frage aufkommen, ob dieser Ionenkanal in diesen Zellen durch die Expression der  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Untereinheit geregelt wird. In der vorliegenden Arbeit wird auf diese Frage eingegangen.

#### OOZYTEN ALS EXPRESSIONSSYSTEM

Wie bereits mehrfach angesprochen, lassen sich die Eigenschaften von ENaC relativ einfach durch heterologe Expression des Kanals in Oozyten des südafrikanischen Kralenfrosches *Xenopus laevis* studieren. Diese werden bereits seit Jahrzehnten zur Expression exogener mRNA verwendet. Obwohl die Zellmembran der Oozyten normalerweise eine Vielzahl von Ionenkanälen enthält, treten diese nur in einer geringen Dichte auf. Da die Oozyten aber in der Lage sind, nach Injektion kanalspezifischer cRNA Ionenkanäle in großer Dichte in der Zellmembran zu exprimieren, ist es möglich, die Eigenschaften dieser Kanäle zu untersuchen [Dascal (1987)]. Des weiteren sind die Oozyten aufgrund ihrer Größe verhältnismäßig einfach zu handhaben. Mit einem Durchmesser von etwa 1 mm sind sie mit bloßem Auge erkennbar und können mit einfachen Hilfsmitteln bearbeitet werden. Auch erlaubt die große Kapazität der Zellen die Injektion relativ großer Volumina von mRNA-Lösungen (bis zu 100 nl). Schließlich ermöglicht die Größe der Oozyten die relativ einfache und zuverlässige Anwendung elektrophysiologischer Meßtechniken wie die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme, bei der zwei Mikroelektroden in die Zelle eingestochen werden müssen.

Um als Expressionssystem für exogene Ionenkanäle verwendet werden zu können, muß allerdings sichergestellt werden, daß endogene Ionenkanäle der Oozyte mit den zu untersuchenden Ionenkanälen nicht interferieren. Dafür ist es notwendig, die endogenen Ionenkanäle der Oozyten zu kennen.

## ENDOGENE KANÄLE IN *XENOPUS LAEVIS* OozyTEN

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bisher charakterisierten endogenen Ionenkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten. Im Hinblick auf mögliche Interferenzen mit ENaC Expressionsstudien sind insbesondere die endogenen Na<sup>+</sup>-Kanäle und nichtselektiven Kationenkanäle von Interesse.

Der durch langanhaltende Depolarisation aktivierte Na<sup>+</sup>-Kanal kann von ENaC durch seine Blockersensitivität abgegrenzt werden: Er wird lediglich durch hohe Konzentrationen von Tetrodotoxin gehemmt, wohingegen Amilorid auf diesen Ionenkanal keine Wirkung haben soll. Dieser Kanal soll während der Fertilisation eine Rolle spielen. Seine Aktivierung löst vermutlich den Einwärtsstrom aus, der die Zellmembran depolarisiert und damit das Eindringen weiterer Spermien (Polyspermie) verhindert [Kado et al. (1979); Bossi et al. (1998)].

Die physiologische Bedeutung der durch NH<sub>4</sub>Cl induzierten Na<sup>+</sup>-Leitfähigkeit ist bisher unbekannt [Burckhardt & Burckhardt (1997)]. Darüberhinaus gibt es offenbar eine weitere Na<sup>+</sup>-Leitfähigkeit, die durch hohe extrazelluläre ATP-Konzentrationen (EC<sub>50</sub>=0,2 mM) aktiviert und durch Amilorid in einer mittleren Hemmkonzentration von ca. 2 mM gehemmt werden kann [Kupitz & Atlas (1993)]. Unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit wurde diese Leitfähigkeit jedoch nicht beobachtet. Der endogene Amilorid-sensitive Na<sup>+</sup>-Kanal in *Xenopus laevis* Oozyten wird durch ca. 10 mM Amilorid gehemmt. Die Amiloridderivate Benzamil und Phenamil haben auf diesen Na<sup>+</sup>-Kanal keine Wirkung, im Gegensatz zu ENaC, der für diese beiden Substanzen sogar eine höhere Sensitivität aufweist als für Amilorid [Weber et al. (1995)].

Die endogenen nichtselektiven Kationenkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten sind unter Kontrollbedingungen kaum aktiv. Sie werden durch hohe extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen gehemmt, sowie auch durch Amilorid, Gentamicin, Gd<sup>3+</sup> und durch zwei bekannte Hemmstoffe von Cl<sup>-</sup>-Kanälen: Flufenaminsäure und Nifluminsäure [Arellano et al. (1995); Zhang et al. (1998)].

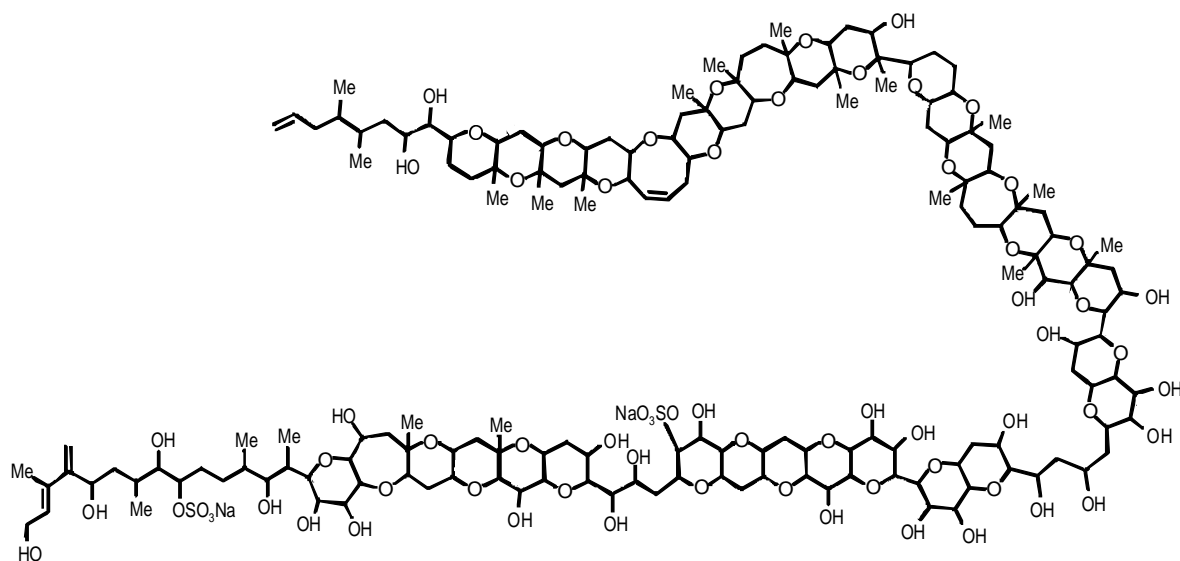
**Tab. 1** Endogene Ionenkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten, modifiziert nach Weber, (1999)  
 Abkürzungen: Flu = Flufenaminsäure, Niflu = Nifluminsäure, Ami = Amilorid, Genta = Gentamicin, Benz = Benzamil, Phen = Phenamil

Substrat	Beschreibung des Ionenkanals	Aktivierung	Hemmung	Weitere Eigenschaften	Literatur
Na <sup>+</sup>	Aktivierung durch lang-anhaltende Depolarisation	Depolarisation	Tetrodotoxin	Ca <sup>2+</sup> -abhängig, beteiligt an Fertilisationsantwort	Bossi et al. (1998), Kado et al. (1981)
Na <sup>+</sup>	Induktion durch NH <sub>4</sub> Cl	NH <sub>4</sub> Cl		physiolog. Bed. unbekannt	Burckhardt et al. (1997)
Na <sup>+</sup>	Aktivierung durch ATP	ATP	Amilorid (K <sub>i</sub> =2,12 mM)		Kupitz & Atlas (1993)
Na <sup>+</sup>	amiloridsensitiv		Amilorid (10 mM)	n. sens. gg. Benz, Phen	Weber et al. (1995)
K <sup>+</sup>	Inhibition durch TEA und Ba <sup>2+</sup>	Depolarisation	TEA, Ba <sup>2+</sup>	pH sensitiv	Burckhardt et al. (1992), Huang et al. (1995)
K <sup>+</sup>	TEA-sensitiv, Ba <sup>2+</sup> -insensitiv		TEA	n. sens. gg. Ba <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	Lu et al. (1990)
K <sup>+</sup>	kleiner K <sup>+</sup> -Kanal (IsK, minK)		Ba <sup>2+</sup> , Chlofilium		Ben-Efraim et al. (1996)
Ca <sup>2+</sup>	spannungsabhängig	Depolarisation	Ca <sup>2+</sup> , ω-Conotoxin	Bildung sog. Ca <sup>2+</sup> -Signale in Oozyten	Dascal et al. (1986), Lacerda et al. (1994)
Ca <sup>2+</sup>	abhängig von intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Speichern	Ca <sup>2+</sup> -Speicher Entleerung	Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Niflu, ω-Conotoxin		Girard et al. (1993), Lomax et al. (1998), Yao et al. (1997)
Kationen, me- chanosensitiv	Aktivierung durch Dehnung der Zellmembran	Dehnung	Ami (K <sub>i</sub> =500 mM), Ben, Phen, Gd <sup>3+</sup>	Perm.: K <sup>+</sup> >NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> >Cs <sup>+</sup> >Rb <sup>+</sup> =Na <sup>+</sup> >Li <sup>+</sup> >Ca <sup>2+</sup>	Lane et al. (1991), (1992), Yang et al. (1989), (1990)
Kat., nichtselektiv	"hemi-gap-junctional"	Depolarisation	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	temperaturabhängig	Ebihara (1996)
Kat., nichtselektiv	Induktion durch Palytoxin	Palytoxin			Wang et al. (1997)
Kat., nichtselektiv	Permeabilität für NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Trimethylamin	La <sup>3+</sup> , DPC, pCMB		Burckhardt et al. (1992), (1995)
Kat., nichtselektiv	Inaktivierung durch Ca <sup>2+</sup>	Inaktivierung durch Ca <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup> , Ami, Genta, Gd <sup>3+</sup> , Flu, Niflu	Perm.: K <sup>+</sup> >NMDG <sup>+</sup> >TEA <sup>+</sup> >TPA <sup>+</sup> >TBA <sup>+</sup> >Gluk.=Cl <sup>-</sup>	Arrelano et al. (1995), Zhang et al. (1998)
Cl <sup>-</sup>	Aktivierung durch Ca <sup>2+</sup>	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , Trypsin	DPC, 9-AC, Flu, Niflu, La <sup>3+</sup> , Gd <sup>3+</sup>	Perm.: I <sup>-</sup> >Br <sup>-</sup> >Cl <sup>-</sup>	Durieux et al. (1994), Katayama et al. (1991), Tokimasa et al. (1996), White et al. (1995)
Cl <sup>-</sup>	Inaktivierung durch Ca <sup>2+</sup>	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Entzug	Ca <sup>2+</sup> , Flu, Niflu, DPC, 9-AC	Fertilisationsantwort	Weber et al. (1995)
Cl <sup>-</sup>	Induktion durch Hyperpolarisation	Hyperpolarisation	SITS, Ba <sup>2+</sup> , La <sup>3+</sup>	Perm.: I <sup>-</sup> >NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> >Br <sup>-</sup> >Cl <sup>-</sup> >Propionat>Acetat	Kowdley et al. (1994), Tokimasa et al. (1996)
Cl <sup>-</sup>	Aktivierung durch Hypotonie	Hypotonie	La <sup>3+</sup>	n. sens. gg. Ca <sup>2+</sup> , Niflu	Ackerman et al. (1994)
Wasser	osm. Gradient	osm. Gradient			Verkman et al. (1996)

## MAITOTOXIN UND OOZYTEN

Maitotoxin (MTX) ist ein polyzyklischer Äther, der aus dem Dinoflagellaten *Gambierdiscus toxicus* gewonnen wird (s. Abbildung 4). Es stellt eines der stärksten marinen Toxine dar, die heute bekannt sind. In unterschiedlichen Geweben ruft MTX ein großes Spektrum an zellulären Antworten hervor: (1)  $\text{Na}^+$ -Aufnahme und  $\text{K}^+$ -Verlust [Sladeczek et al. (1988); Pesando et al. (1991)], (2) Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms [Bernard et al. (1988); Sladeczek et al. (1988); Murata et al. (1992); Soergel et al. (1992); Gusovsky et al. (1993); Venant et al. (1994); Daly et al. (1995)] und Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Bestände [Pesando et al. (1991)], (3) Stimulation der Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) [Bernard et al. (1988); Gusovsky et al. (1990); Soergel et al. (1992); Venant et al. (1994)], (4) Stimulation der Phosphorylierung von Tyrosin [Gusovsky et al. (1993)], (5) Stimulation der Hormonsekretion [Soergel et al. (1992)] und Transmitterfreisetzung [Takahashi et al. (1983)] und (6) Auslösung von Membranveränderungen, die sonst nur nach Eindringen eines Spermiums beobachtet werden [Bernard et al. (1988)]. Noch ist unklar, welcher Effekt am ehesten verantwortlich für die Toxizität von MTX ist und ob die unterschiedlichen Antworten auf MTX auf einem gemeinsamen initialen Mechanismus beruhen.

Im Falle der *Xenopus* Oozyten wurde gezeigt, daß die Applikation von MTX die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat auslöst, die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht und Membranveränderungen induziert, die sonst nur im Rahmen einer Befruchtung der Oozyten beobachtet werden [Bernard et al. (1988)]. In Amphibienoozy-



**Abb. 4** Maitotoxin, Strukturformel (nach Murata et al. (1993))

ten wurde festgestellt, daß während des Übergangs von Prophase zu Metaphase bemerkenswerte Änderungen der Ionenpermeabilitäten auftreten [Bernard et al. (1988)]. Die erste Antwort auf eine Befruchtung besteht bei einer Vielzahl von Spezies in einer schnellen Depolarisation, die wahrscheinlich durch eine Erhöhung der Na<sup>+</sup>- oder der Cl-Leitfähigkeit verursacht wird [Kline & Nuccitelli (1985); Kupitz & Atlas (1993)]. In letzter Zeit wurde vermutet, daß der initiale Effekt von MTX auf der Aktivierung eines nichtselektiven Kationenkanals beruht [Dietl & Völkl (1994); Musgrave et al. (1994); Worley et al. (1994); Estacion et al. (1996); Nishio et al. (1996); Leech & Habener (1997)].

### ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Grundlage des ersten Teils dieser Arbeit ist der Nachweis und die Charakterisierung der MTX-aktivierten nichtselektiven Kationenkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten. Mit Hilfe des elektrophysiologischen Verfahrens der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme („*Two-Electrode-Voltage-Clamp*“) soll die Wirkung von MTX auf das Membranpotential (in Stromklemme) und auf den transmembranären Ganzzellstrom (in Spannungsklemme) in *Xenopus* Oozyten untersucht werden. Weiterhin soll der MTX-induzierte Strom charakterisiert werden durch die Untersuchung seiner Abhängigkeit von der MTX-Konzentration, seiner Selektivität für Kationen und seiner Empfindlichkeit für bekannte Hemmstoffe nichtselektiver Kationenkanäle.

Im zweiten Teil der Arbeit wird M-1 mRNA gemeinsam mit verschiedenen Kombinationen von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC cRNA in Oozyten injiziert und der dadurch induzierte Amilorid-sensitive Einwärtsstrom unter Anwendung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme untersucht. Dabei soll die Frage geklärt werden, ob die mit molekularbiologischen Methoden beobachtete unterschiedlich starke Transkription der einzelnen ENaC Untereinheiten in M-1 Zellen auf funktioneller Ebene bestätigt werden kann, d.h. ob die Koinjektion von M-1 mRNA mit der cRNA der  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC Untereinheit in *Xenopus laevis* Oozyten zur Ausbildung eines größeren Amilorid-sensitiven Stroms führt als die alleinige Injektion von M-1 mRNA. Außerdem soll untersucht werden, ob die exprimierten Ionenkanäle nach Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC cRNA in unterschiedlichen Kombinationen andere Eigenschaften haben als Ionenkanäle nach Injektion aller drei Untereinheiten von rENaC oder als der in M-1 Zellen beobachtete Amilorid-sensitive Na<sup>+</sup>-Kanal.

---

## Material und Methoden

### GEWINNUNG DER OOZYTEN

Um die Oozyten der *Xenopus laevis*-Weibchen zu erhalten, wurden einzelne Lappen eines Ovars unter Narkose durch einen Leistenschnitt entfernt. Zum Teil wurden auch Ovarien von frisch getöteten Fröschen verwendet, die für Praktikumsexperimente im Zentrum der Physiologie benutzt wurden. Die Oozyten wurden durch enzymatische Verdauung mit Kollagenase von der umgebenden Schicht aus Follikelepithelzellen isoliert (defollikuliert). Dazu wurde das ovarielle Gewebe bei 18-20 °C über Nacht in 1 mg/ml Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* mit einer Aktivität von 0,8 U/mg in modifiziertem *Barth's* Medium (s. Kap. „Lösungen“) oder in 2,5 mg/ml Kollagenase für vier bis sechs Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Oozyten fünf Minuten in Ca<sup>2+</sup>-freiem modifiziertem *Barth's* Medium inkubiert und zuletzt mehrmals mit modifiziertem *Barth's* Medium gewaschen und bei 18-20 °C ebenfalls in modifizierter *Barth's* Lösung aufbewahrt. Um bakterielles Wachstum zu verhindern, wurden der Lösung 10 IE/ml Natriumpenicillin und 10 µg/ml Streptomycinsulfat oder 70 µg/ml Gentamicinsulfat zugesetzt. Unter dem Mikroskop wurden defollikulierte Oozyten im Reifestadium V bis VI (in arreierter Prophase der ersten meiotischen Teilung) ausgewählt, die eine einheitliche Pigmentierung mit scharfer Abgrenzung zwischen dem hellen vegetativen und dem dunklen animalischen Pol zeigten.

Für Experimente mit Expression epithelialer Kationenkanäle wurden die Oozyten innerhalb eines Tages nach ihrer Gewinnung mit cRNA bzw. mRNA injiziert. Nach der Injektion wurden die Oozyten 20-34 h inkubiert, bevor die Expression epithelialer Kationenkanäle mit dem Zwei-Elektroden-Spannungsklemmverfahren (*Voltage-clamp*) untersucht wurde. Für die Untersuchung endogener nichtselektiver Kationenkanäle wurden Oozyten innerhalb von sieben Tagen nach ihrer Gewinnung mit dem Zwei-Elektroden-Spannungsklemmverfahren (*Voltage-clamp*) untersucht.

### ZELLKULTUR

Die M-1 Zellen wurden in unbeschichteten Gewebekulturschalen (Becton Dickinson, Plymouth, England) gezüchtet und bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % im Brutschrank gehalten. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit 0,05 % Tryp-



sin/0,53 mM EDTA in einem  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freien Phosphatpuffer (PBS) in Suspension gebracht. Die Trypsinwirkung wurde abgebremst durch Zugabe von proteinhaltigem Earle's MEM Zellkulturmedium (Gibco-BRL/Life Technologies, Eggenstein) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS: Seromed/Biochrom KG, Berlin). Die Zellsuspension wurde 5 min bei 141 g zentrifugiert, und die Zellen wurden dann in PC-1 Medium resuspendiert. PC-1 ist ein speziell zusammengesetztes proteinarmes Zellkulturmedium (Hycor Biomedical, Irvine, CA), das unter anderem 5  $\mu\text{M}$  Dexamethason und 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Insulin enthält und das mit 2 mM Glutamin, 100 IE/ml Penicillin und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin versetzt wurde. Während der ersten 24 Stunden nach Aussaat wurde fötales Kälberserum zum PC-1 Medium hinzugegeben, um die Anheftung und das Wachstum der Zellen zu beschleunigen. Am ersten Tag nach Aussaat wurden tote Zellen und Zelltrümmer durch Waschen mit PBS entfernt. Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage ausgewechselt, und nach fünf bis neun Tagen hatte sich ein konfluenten Zellrasen gebildet.

#### PRÄPARATION DER M-1 POLY(A)<sup>+</sup> RNA

Für die Präparation von Poly(A)<sup>+</sup> RNA wurden konfluente M-1 Zellen mit eisgekühltem PBS gewaschen und daraufhin mit einem Zellschaber („cell scraper“, Costar, Cambridge, MA, USA) von der Unterlage entfernt. Für 60 cm<sup>2</sup> Zellrasen wurde 1 ml PBS verwendet. Nach Zentrifugieren bei 141 g wurden die Zellen mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C bis zur Extraktion der Gesamt-RNA aufbewahrt.

#### Extraktion der RNA

Die Zellen wurden in 1 ml Guanidinthiocyanatpuffer, der 4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Na-Citrat, 0,5 % Sarcosyl, 0,1 M 2-Mercaptoethanol enthält, bei Raumtemperatur homogenisiert. Nach Überführung in ein neues Gefäß wurden der Mischung nacheinander 0,1 ml 2-molares Natriumacetat, 1 ml Phenol (H<sub>2</sub>O gesättigt) und 0,2 ml einer Chloroformisoamyl-Alkoholmischung (49:1) unter vorsichtigem Umwenden zugesetzt. Die entstandene Suspension wurde 10 s kräftig geschüttelt und 15 min eisgekühlt, bevor die Proben bei 4 °C für 20 min bei 10000 g zentrifugiert wurden. Nach dem Zentrifugieren lag die RNA in der wässrigen Phase vor, während die DNA und Proteine sich in der Interphase und der Phenolphase befanden.

### *Präzipitation*

Die wäßrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 1 ml Isopropanol vermischt und für mindestens eine Stunde bei -20 °C zur Präzipitation inkubiert.

### *Repräzipitation*

Nach weiterem Zentrifugieren bei 10000 g über 20 min wurde der dabei entstandene Niederschlag in 0,3 ml Guanidinthiocyanatpuffer gelöst, in ein Eppendorfröhrchen überführt und mit einem Volumenanteil Isopropanol bei -20 °C für eine Stunde präzipitiert.

### *Waschen*

Das nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C für 10 min in einer Eppendorfszentrifuge entstandene RNA-Kügelchen wurde in 75 % Ethanol resuspendiert, sedimentiert, für 15 min vakuumgetrocknet und in 50 µl 0,5-prozentigem Natriumdodecylsulfat bei 65 °C für 10 min gelöst (nach [Chomczynski & Sacchi (1987)]). Abschließend wurde die gewünschte Poly(A)<sup>+</sup> RNA über Oligo(dT) Zellulosesäulen (Life Technologies, Rockville, MD, USA) von der Gesamtheit der RNA abgetrennt.

## **PRÄPARATION DER rENaC cRNA**

Die vollständigen cDNA-Klone von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC wurden von Prof. Dr. B. Rossier (Lausanne) zur Verfügung gestellt. Als Transkriptionsvektoren wurden pSD5 [McNicholas & Canessa (1997)] und pSPORT (Life Technologies, Karlsruhe) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen (BglII für  $\alpha$ - und  $\beta$ -rENaC in pSD5, PvuII für  $\gamma$ -rENaC in pSD5 und NotI für  $\gamma$ -rENaC in pSPORT) linearisiert. Danach wurde sie mit SP6-Polymerase ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC in pSD5) oder T7-Polymerase ( $\gamma$ -rENaC in pSPORT) *in vitro* transkribiert.

## **VERSUCHSANORDNUNG UND DURCHFÜHRUNG**

### *Injektionskammer*

Die für die Injektionen verwendete Kammer bestand aus einer Petrischale (Durchmesser ca. 4 cm), an deren Boden eine Plexiglasscheibe aufgeklebt war, in die fünf Rinnen von

1 bis 2 mm Breite eingelassen waren. Die Oozyten wurden mit einer Pipette in diesen Rinnen aufgereiht, jeweils mit dem animalischen Pol nach oben.

### *Kapillaren*

Für die Injektionen wurden Glaskapillaren ohne Filament benutzt (Hilgenberg), die an einem programmierbaren Elektroziehgerät vom Typ Flaming/Brown P-87 (Sutter Instruments Company, San Rafael, CA, USA) gezogen wurden. Nach dem Einsetzen der Kapillare in das Injektionsgerät wurde unter Beobachtung mit 16-facher Vergrößerung die nach dem Ziehen der Kapillare noch verschlossene Spitze mit einer feinen Pinzette abgebrochen, so daß sie so fein wie möglich und ihre Öffnung groß genug für das Aufsaugen und Ausspritzen von Flüssigkeiten war (ca. 3-8  $\mu\text{m}$ ).

### *Aufbau der Pumpe*

Das Prinzip des Injektionsgerätes (Bachofer, Reutlingen) beruht auf einem dünnen Metallstift, der durch einen Elektromotor langsam vom hinteren Ende der Kapillare in das Kapillarlumen vorgeschoben wird. Dadurch entsteht ein Überdruck, die inkompressible Flüssigkeit wird verdrängt und kann durch die feine Öffnung an der Spitze der Kapillare entweichen. Bei Rotation des Stifts in umgekehrter Richtung entsteht ein Unterdruck in der Kapillare, so daß Luft oder Flüssigkeiten aufgesogen werden können. Die Drehgeschwindigkeit des Elektromotors war auf eine Injektionsgeschwindigkeit von 100 nl/min eingestellt.

### *Aufbau der gesamten Apparatur*

Die Kapillaren wurden durch eine Kanüle mit Mineralöl (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) gefüllt und in das gleichfalls ölgefüllte und dadurch luftfreie Injektionsgerät eingesetzt. Über einen an einem Stativ befestigten Mikromanipulator konnte das Injektionsgerät in drei Ebenen bewegt werden.

### *Injektion der RNA*

Die M-1 mRNA wurde in Eppendorfgefäßen in Portionen von jeweils 2,5  $\mu\text{l}$  bzw. 1,5  $\mu\text{l}$  und die rENaC cRNA in Portionen von 500 nl bei -80 °C aufbewahrt. Die RNA wurde bei

Bedarf aufgetaut und nach dem jeweiligen Versuchsprotokoll für den folgenden Tag gemischt.

Für jede Versuchsreihe mit Koexpression zweier RNA wurden vier verschiedene Injektionsprotokolle durchgeführt. Die RNA-Kombinationen sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Versuchsreihe	I	II	III	IV
1	$\alpha + \beta + \gamma$	$\alpha + \text{M-1}$	$\alpha$	M-1
2	$\alpha + \beta + \gamma$	$\beta + \text{M-1}$	$\beta$	M-1
3	$\alpha + \beta + \gamma$	$\gamma + \text{M-1}$	$\gamma$	M-1
4	$\alpha + \beta + \gamma$	$\alpha + \beta + \text{M-1}$	$\alpha + \beta$	M-1
5	$\alpha + \beta + \gamma$	$\alpha + \gamma + \text{M-1}$	$\alpha + \gamma$	M-1
6	$\alpha + \beta + \gamma$	$\beta + \gamma + \text{M-1}$	$\beta + \gamma$	M-1
7	$\alpha + \beta + \gamma$	$\alpha + \beta + \gamma + \text{M-1}$		

Es wurden jeweils 500 nl cRNA in einer Konzentration von 0,1 g/l bzw. 1,5  $\mu\text{l}$  mRNA in einer Konzentration von 0,67 g/l verwendet. Mit DEPC  $\text{H}_2\text{O}$  (0,2 %) wurde die Mischung gegebenenfalls auf 2,5  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Pro Versuchstag wurden 800 nl verwendet; der Rest wurde wieder eingefroren und in späteren Versuchen benutzt. Für die Koexpressionsexperimente von allen rENaC Untereinheiten mit M-1 mRNA ergab die Mischung der verschiedenen Ansätze ein Volumen von 3,0  $\mu\text{l}$ , dem 1,0  $\mu\text{l}$  pro Versuchstag entnommen wurde. Entsprechend erhöhte sich bei diesen Experimenten das pro Zelle injizierte Volumen von 50 auf 60 nl, wohingegen die Menge der injizierten RNA gleich blieb (s.u.).

Der zu injizierende Tropfen RNA wurde in den Deckel eines Eppendorfgefäßes gebracht und sofort mit Mineralöl überschichtet, um Verdunstung zu verhindern. Unter Sichtkontrolle wurde nun mit der Injektionskapillare in den RNA-Tropfen, der anhand

der Wasser-Öl-Grenze ausgemacht werden konnte, eingedrungen und die Flüssigkeit aufgesogen. Das Injektionsvolumen, das mit einer Pumprate von 100 nl/min in 30 bzw. 36 s eingebracht wurde, enthielt jeweils 1 ng cRNA der jeweiligen rENaC Untereinheit bzw. 20 ng M-1 mRNA.

#### *Die „Voltage-Clamp“-Technik*

Die elektrischen Messungen wurden in der Regel 20-34 h nach Injektion durchgeführt. Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Expression an mit allen drei rENaC-Untereinheiten injizierten Oozyten zeigten, daß sich die Amilorid-sensitive Stromkomponente 20 oder mehr Stunden nach Injektion nicht mehr signifikant veränderte.

Die *Voltage-Clamp*-Technik ist eine Methode zur Messung von Ionenströmen durch Zellmembranen, die es erlaubt, Änderungen der Ionenströme nach Applikation von Pharmaka oder infolge von Veränderungen des Membranpotentials und der Ionenzusammensetzung der Badlösung zu erfassen. Die Zellmembran wird von zwei fein ausgezogenen Glaskapillaren (Mikroelektroden) durchdrungen, die mit 3-molarer KCl-Lösung gefüllt sind und über ein Silber-/Silberchlorid-Pellet mit dem Verstärker verbunden sind; die Referenzelektroden tauchen in das die Oozyte umgebende Bad ein. Ein Elektrodenpaar mißt die Spannung zwischen Oozyte und Bad, das andere erlaubt Strom einzuspeisen. Wird der transmembranäre Strom nun auf 0 A geklemmt, so mißt das erste Elektrodenpaar das Ruhemembranpotential. Diese Meßordnung bezeichnet man als Stromklemme. Bei der Spannungsklemme wird über das Stromelektrodenpaar so viel Strom eingespeist, bis das andere Elektrodenpaar eine vorgewählte Spannung anzeigt. Die erforderlichen Ströme werden gemessen, und ihre Veränderung nach Austausch der Badlösung oder Zugabe von Pharmaka zum Bad wird untersucht.

Die Mikroelektroden für die *Voltage-clamp*-Experimente wurden aus Filament-Borosilikatglaskapillaren (Hilgenberg) mit einem Außendurchmesser von 1,50 mm, einem Innendurchmesser von 0,87 mm und einer Filamentdicke von 0,2 mm an dem o.g. Elektrodenziehgerät gezogen. Mit Hilfe einer Kanüle wurden die Kapillaren durch die Öffnung an ihrem oberen Ende mit einer 3-molaren Kaliumchloridlösung gefüllt, die vorher filtriert worden war (Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm, Millipore). Die Kapillaren wiesen beim Eintauchen in Standard-Froschringerlösung (NaCl-FR, siehe Tabelle für Lö-

sungen) Widerstände von 0,5-3,0 M $\Omega$  für die Spannungselektrode und 0,5-1,5 M $\Omega$  für die Stromelektrode auf. Für die Durchführung der Experimente wurde eine runde Versuchskammer mit einem Durchmesser von 3,0 cm und einer Badtiefe von ca. 0,3 cm bei einem Volumen von ca. 200  $\mu$ l verwendet. Sie wurde kontinuierlich mit einer Rate von 3-12 ml/min durchspült. Diese Flußkammer war mit einem Verteiler verbunden, an den acht Gefäße für unterschiedliche Badlösungen angeschlossen werden konnten. So konnten Lösungswechsel über ein Ventil durch ein einfaches der Schwerkraft folgendes Saugsystem vorgenommen werden. Für einen vollständigen Lösungswechsel wurden nur wenige Sekunden benötigt. Über einen Kanal war die eigentliche Versuchskammer mit einer kleineren Kammer verbunden, die mit einer Absaugvorrichtung versehen war.

Nach Eindringen der beiden Mikroelektroden in die Zelle wurden die Oozyten auf ein Haltepotential von in der Regel -60 mV geklemmt. Die durch epitheliale Natriumkanäle verursachten Ströme wurden aus der Differenz des Ganzzellstroms vor und nach Gabe von 2  $\mu$ M Amilorid, einem potenten Hemmstoff des ENaC, in die Badlösung bestimmt. An jedem Versuchstag wurden Kontrollexperimente an mit  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC cRNA injizierten Oozyten durchgeführt, und alle übrigen am selben Tag registrierten Meßwerte wurden auf den mittleren Amilorid-sensitiven Einwärtsstrom dieser Kontrollwerte normiert.

Ströme durch Maitotoxin(MTX)-aktivierte Kationenkanäle konnten durch Ersatz der Na<sup>+</sup>-Ionen im Bad durch schlecht permeierende N-Methyl-D-Glucamin-Kationen (NMDG) unterdrückt werden. Die Größe dieser Ströme wurde aus der Differenz des Ganzzellstroms vor und nach Gabe von NMDG ermittelt. Um bei den Experimenten zu MTX-aktivierten Kationenkanälen Zellen mit Membranschäden auszuschließen, wurden nur Oozyten in die Studie aufgenommen, die ein Ruhemembranpotential  $V_m \leq -60$  mV aufwiesen oder alternativ bei einem Haltepotential von -60 mV (bzw. in den ersten Experimenten von -100 mV) einen Einwärtsstrom von weniger als 200 nA zeigten.

Die Oozyten wurden durch ein Stereomikroskop der Firma Zeiss bei 16-facher Vergrößerung beobachtet. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (22-25 °C) durchgeführt.

### Geräte

Die Versuche wurden an einem *Turbo TEC 01C* Verstärker (npi Electronic, Tamm) durchgeführt, und mit einem Schreiber (Kipp & Zonen, Erkerode) wurde sowohl der Strom als auch die Spannung über der Zellmembran auf Papier aufgezeichnet.

Konventionsgemäß werden Einwärtsströme (Kationenströme vom extrazellulären in den intrazellulären Raum bzw. Anionenströme in umgekehrter Richtung) mit negativem, Auswärtsströme (Kationenströme von der zytosolischen zur extrazellulären Seite der Zellmembran, Anionenströme entsprechend umgekehrt) mit positivem Vorzeichen angegeben.

### Lösungen

Die Mikroelektroden waren gefüllt mit 3-molarer KCl-Lösung. Die Perfusionslösungen für die Oozytenkammer, bzw. das Lagerungsmedium für die Oozyten waren wie folgt zusammengesetzt:

	NaCl	KCl	NMDG Cl	Na HCO <sub>3</sub>	Mg SO <sub>4</sub>	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	Hepes	pH
NaCl-FR <sup>1</sup>	115	2	-	-	-	-	1	1	10	7,4
NMDG-FR <sup>2</sup>	-	2	115	-	-	-	1	1	10	7,4
mod. <i>Barth's</i> <sup>3</sup>	88	1	-	2,4	0,82	0,3	0,41	-	15	7,6

(Angaben in mM)

Um bakterielles Wachstum in den Lösungen zu verhindern, wurde das modifizierte *Barth's* Medium mit 10 IE/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin bzw. mit 70 µg/ml Gentamicin versetzt.

<sup>1</sup>NaCl-Frosch-Ringerlösung

<sup>2</sup>NMDG-Frosch-Ringerlösung

<sup>3</sup>modifiziertes *Barth's* Medium

Für Experimente, in denen die Selektivität von MTX-aktivierten Kationenkanälen untersucht wurde, wurde in der Frosch-Ringerlösung (NaCl-FR) das gesamte NaCl (115mM) durch eine äquimolare Menge von KCl, LiCl, NH<sub>4</sub>Cl oder N-Methyl-D-Glucamin-Chlorid (NMDG-Cl) ersetzt. Um den Effekt zweiwertiger Kationen im Rahmen der Untersuchung MTX-aktivierter Kationenkanäle zu überprüfen, wurde das im Bad befindliche NaCl (115 mM) durch jeweils 57,5 mM MnCl<sub>2</sub> oder 57,5 mM CaCl<sub>2</sub> ersetzt. Die Hyposmolarität dieser Lösungen wurde durch Zugabe von 57,5 mM Mannitol ausgeglichen.

Die folgende Tabelle führt die verwendeten Wirkstoffe und Inhibitoren sowie deren Bezugsquellen auf.

Kurzbezeichnung	Substanz	Herkunft
Amiloridhydrochlorid	3,5-diamino-N-(Aminoiminomethyl)-6-Chloropyrazincarboxamid	Sigma, Deisenhofen
Benzamil		RBI, Nattick, Mass., USA
DCDPC	3',5'-Dichlorodiphenylamin-2-Carboxylsäure	Hoechst, Frankfurt/ Main
Flufenaminsäure		Sigma, Deisenhofen
Gadolinium		Sigma, Deisenhofen
LOE 908	(RS)-(3,4-Dihydro-6,7-Dimethoxyisochinolin-1-γ1)-2-Phenyl-N,N-Di-[2-(2,3,4-Trimethoxyphenyl)-Ethyl]-Acetamid	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Maitotoxin (MTX)		Calbiochem, Bad Soden
Nifluminsäure		Sigma, Deisenhofen
SK&F 96365	1-(β-[3-(4-Methoxyphenyl)-Propoxy]-4-Methoxyphenethyl)-1H-Imidazol-Hydrochlorid	SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Welwyn, UK



*Statistik*

Bei den angegebenen Daten handelt es sich um die arithmetischen Mittelwerte  $\pm$  SEM (*standard error mean* = mittlerer Fehler der Mittelwerts). Beim Vergleich von Datensätzen aus unterschiedlichen Experimenten wurde zur Bestimmung der Signifikanz der ungepaarte *t*-Test angewandt. Wenn es sich um Datensätze handelte, die aus demselben Experiment an denselben Zellen unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen stammten, wurde die Signifikanz unter Verwendung des gepaarten *t*-Tests überprüft. Zwei Datensätze wurden als signifikant verschieden voneinander erkannt, wenn  $p < 0,05$  war, und mit \* gekennzeichnet. Zur genaueren Einteilung wurden Signifikanzen von  $p < 0,01$  mit \*\* und  $p < 0,001$  mit \*\*\* gekennzeichnet. Fehlende Signifikanz wurde mit n.s. (nicht signifikant), die Anzahl der durchgeführten Experimente mit „n“ angegeben.

---

## Ergebnisse

### I. NICHTSELEKTIVE MTX-AKTIVIERTE KATIONENKANÄLE IN XENOPUS OozyTEN

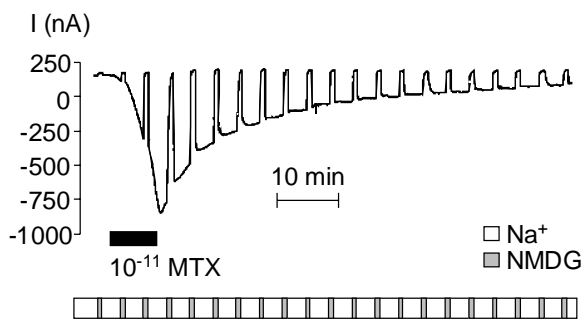
Der erste Teil dieser Arbeit befaßt sich mit endogenen durch Maitotoxin stimulierbaren nichtselektiven Kationenkanälen in *Xenopus laevis*-Oozyten.

#### *Ruhemembranpotential und stationäre Membranströme*

Das Ruhemembranpotential ( $V_m$ ) der in dieser Arbeit verwendeten Oozyten betrug  $V_m = -62 \pm 4$  mV ( $n=84$ ). Bei einem Haltepotential von  $-60$  mV zeigten die Oozyten in Abhängigkeit von ihrem anfänglichen Ruhemembranpotential entweder einen Einwärts- oder einen Auswärtsstrom. In Oozyten mit einem negativeren Ruhepotential als  $-60$  mV wurde ein durchschnittlicher Auswärtsstrom von  $89 \pm 8$  nA ( $n=37$ ) gemessen. Zwei Oozyten hatten ein Ruhemembranpotential von  $V_m = -60$  mV. In Oozyten mit einem positiveren Ruhepotential als  $-60$  mV wurde ein Einwärtsstrom von  $-93 \pm 12$  nA gemessen (Oozyten mit Einwärtsströmen über 200 nA wurden nicht für die Messungen verwendet). Aus der Kenntnis der mittleren intrazellulären Ionenkonzentrationen für durch Collagenase defollikulierte Oozyten ( $K^+$ : 106 mM;  $Na^+$ : 8 mM;  $Cl^-$ : 40 mM [Kusano et al. (1982); Barish (1983); Costa et al. (1989); Cougnon et al. (1996)]), und der Ionenzusammensetzung der Badlösung können die Umkehrpotentiale errechnet werden. Für  $K^+$ -,  $Na^+$ - bzw.  $Cl^-$ -Ionen betragen diese ca.  $-100$  mV,  $67$  mV und  $-28$  mV. Die Permeabilität für diese drei Ionen ist ausschlaggebend für praktisch die gesamte Membranleitfähigkeit von Oozyten. Folglich dürften bei einem Haltepotential von  $-60$  mV die Netto-Auswärtsströme durch einen Ausstrom von  $K^+$  und die Netto-Einwärtsströme durch einen Einstrom von  $Na^+$  und (oder) einen Ausstrom von  $Cl^-$  verursacht sein.

#### *Effekt von MTX*

Die Applikation von MTX in Konzentrationen von 50 pM bis 1 nM depolarisierte die Oozyten rasch. In 84 Zellen fiel das Membranpotential von  $-49 \pm 7$  mV auf  $-14 \pm 1$  mV ab. Anschließender Austausch des im Bad befindlichen  $Na^+$  gegen das schlecht permeierende Kation NMDG (N-methyl-D-Glucamin) hob das Potential  $V_m$  von  $-14 \pm 1$  mV wieder auf  $-53 \pm 5$  mV ( $n=29$ ) an. Dies weist daraufhin, daß MTX eine Kationenleitfähigkeit in *Xenopus laevis* Oozyten aktiviert.

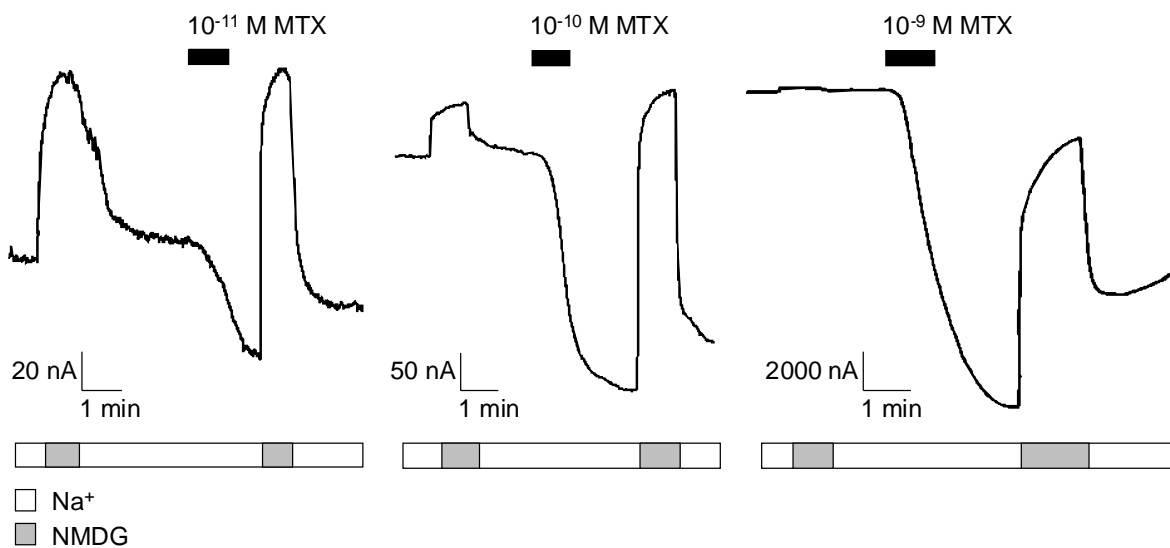


**Abb. 5** Die Aktivierung eines von Natrium getragenen Einwärtsstroms durch MTX ist reversibel. MTX wurde in einer Konzentration von  $10^{-11}$  M appliziert (schwarzer Balken). Während des Experimentes wurde  $\text{Na}^+$  im Bad wiederholt durch das nicht permeierende Kation N-Methyl-D-Glucamin (NMDG, grauer Balken) ersetzt. Die Oozyte war kontinuierlich auf ein Haltepotential von  $-60$  mV geklemmt.

Messungen des transmembranären Stroms bestätigten diese Vermutung (Abb. 5). Die abgebildete Stromlinie wurde an einer Oozyte gemessen, die auf ein konstantes Membranpotential von  $-60$  mV geklemmt war. Unter Kontrollbedingungen in Frosch-Ringer wurde ein kleiner Auswärtsstrom von  $156$  nA beobachtet, der wahrscheinlich von  $\text{K}^+$  getragen wurde (s.o.). Während der Aufzeichnung wurde das extrazelluläre  $\text{Na}^+$  im Bad wiederholt durch NMDG ersetzt, um die von  $\text{Na}^+$  getragene Komponente des Einwärtsstroms zu bestimmen. Unter Kontrollbedingungen vor Applikation von MTX betrug die NMDG-sensitive Stromkomponente  $15$  nA, in 62 gleichartigen Experimenten im Mittel sogar  $80 \pm 9$  nA. Das zeigt, daß *Xenopus laevis* Oozyten unter Kontrollbedingungen eine relativ niedrige  $\text{Na}^+$ -Permeabilität aufweisen. Die Applikation von MTX in einer Konzentration von  $10$  pM induzierte jedoch einen großen Einwärtsstrom, und nachfolgender Entzug von  $\text{Na}^+$  zeigte, daß diese Stromerhöhung vollständig auf einem Anstieg der NMDG-sensitiven Stromkomponente beruhte, die sich im Experiment der Abb. 5 von  $15$  auf  $1020$  nA erhöhte. Der Strom in Abwesenheit von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  war dagegen nicht verändert. Dieser Befund zeigt, daß MTX einen Einwärtsstrom stimuliert, der durch  $\text{Na}^+$  getragen wird. Nach dem Auswaschen von MTX ging der MTX-aktivierte Strom innerhalb von ca.  $60$  min wieder bis in die Nähe des Ausgangswertes zurück, der in der Regel jedoch nicht ganz erreicht wurde, insbesondere nicht bei hohen MTX-Konzentrationen. Bei erneuter Gabe von MTX war die Stromaktivierung auch mehrfach reproduzierbar.

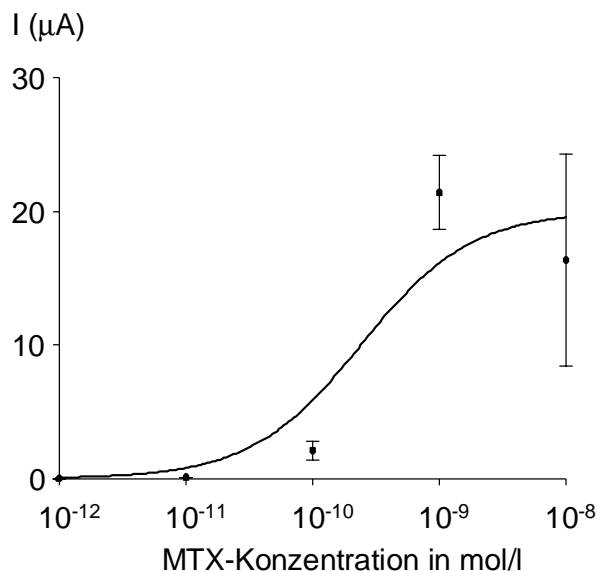
#### *Konzentrationsabhängigkeit des MTX-induzierten Stroms*

Um die Konzentrationsabhängigkeit des MTX-induzierten Stroms zu überprüfen, wurde für jeweils eine Minute MTX in aufsteigenden Konzentrationen von  $1$  pM bis  $10$  nM appliziert (Abb. 6A). Schon die Applikation von  $1$  nM MTX führte zu einer mehr als hundertfachen Erhöhung der NMDG-sensitiven Stromkomponente (von  $0,14 \pm 0,03$   $\mu\text{A}$  auf  $21 \pm 3$   $\mu\text{A}$ ,



**A**

**Abb. 6** Der Effekt von MTX ist konzentrationsabhängig. **A** zeigt repräsentative Stromaufzeichnungen von drei Experimenten, in denen die Oozyten auf  $-60$  mV geklemmt waren. Die schwarzen Balken zeigen die Zugabe von MTX in Konzentrationen von  $10^{-11}$  M,  $10^{-10}$  M und  $10^{-9}$  M zum Bad an. Die durch  $\text{Na}^+$  getragene Einwärtsstromkomponente wurde bestimmt, indem  $\text{Na}^+$  im Bad vollständig durch NMDG (grauer Balken) ersetzt wurde, nachdem der Einwärtsstrom ein Maximum erreicht hatte.



**B**

**B:** Die NMDG-sensitiven Einwärtsströme aus ähnlichen Experimenten wie in **A** sind gegen die MTX-Konzentration ( $10^{-12}$  M bis  $10^{-8}$  M) aufgetragen. Das Michaelis-Menten Diagramm zeigt eine  $\text{EC}_{50}$  von 250 pM. Die einzelnen Punkte stellen Durchschnittswerte von 3-11 Beobachtungen dar. Senkrechte Balken geben die SEM an.

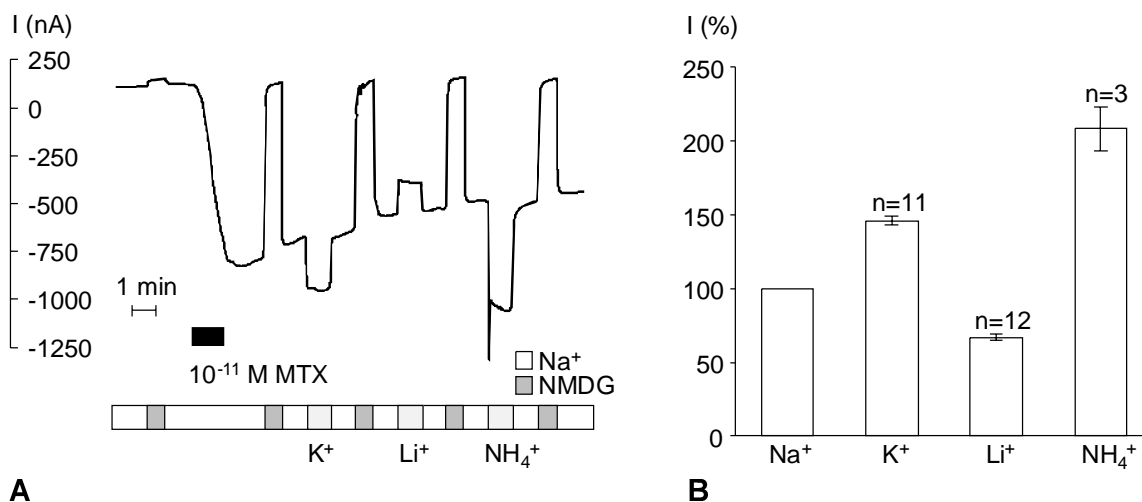
$n=11$ ), und bei maximaler Stimulation der MTX-sensitiven Kanäle konnte der Wert ein 250-faches des Ausgangsstroms erreichen.

Das aus den gewonnenen Werten ermittelte Michaelis-Menten Diagramm (Abb. 6B) ergibt eine halbmaximale Aktivierungskonzentration  $\text{EC}_{50}$  von 250 pM. Dieser Wert be-

findet sich in derselben Größenordnung wie die  $EC_{50}$ -Werte für durch MTX hervorgerufene Effekte in MDCK Zellen,  $BC_3H_1$  Muskelzellen und Astrozyten [Sladeczek et al. (1988); Dietl & Völkl (1994)]. Zu beachten ist, daß in Abb. 6A die Nullstromlinie in Gegenwart von NMDG nach Applikation von MTX in einer Konzentration von  $10^{-9}$  M leicht erhöht wurde. Diese NMDG-insensitive Stromkomponente, die an Oozyten beobachtet wurde, wenn sie hohen MTX-Konzentrationen ausgesetzt waren, könnte möglicherweise durch einen  $Cl^-$ -Ausstrom durch  $Ca^{2+}$ -aktivierte  $Cl^-$ -Kanäle verursacht sein.

### Selektivität für einwertige Kationen

Abb. 7 zeigt ein Experiment, in dem zur Untersuchung der Kationenselektivität des MTX-stimulierten Einwärtsstroms das  $Na^+$  in der Badlösung durch andere Kationen substituiert wurde. MTX wurde in einer Konzentration von 10 pM oder 100 pM zugegeben, um die NMDG-sensitive Komponente des Einwärtsstroms um einen Faktor von mindestens 10-20 zu erhöhen. Während der Phase der langsamen Rückbildung des stimulierten Einwärtsstroms wurde das  $Na^+$  im Bad durch verschiedene einwertige Kationen ersetzt

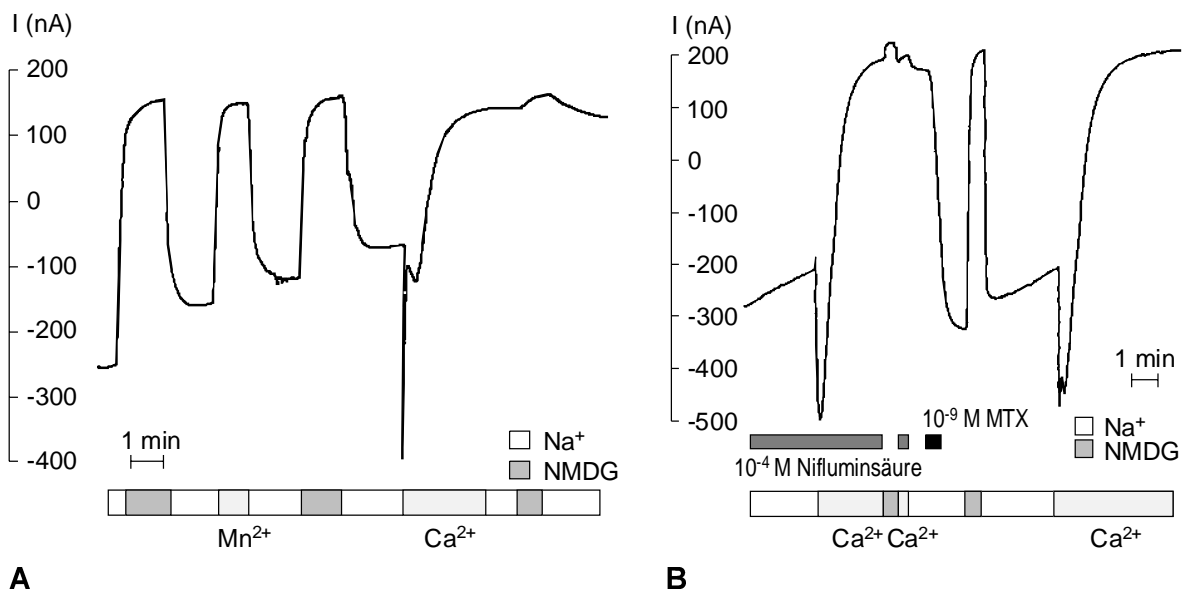


**Abb. 7** Selektivität des MTX-aktivierten Einwärtsstroms für einwertige Kationen. **A** zeigt eine repräsentative Stromaufzeichnung von einer auf  $-60$  mV geklemmten Oozyte. Zur Stimulation eines Einwärtsstroms wurde MTX in einer Konzentration von  $10^{-11}$  M zum Bad gegeben (schwarzer Balken). Die Kationenselektivität dieses Einwärtsstroms wurde getestet, indem  $Na^+$  im Bad durch unterschiedliche Kationen ausgetauscht wurde, wie unter der Aufzeichnung angegeben. **B**: Zusammenfassung der Ergebnisse von zwölf gleichartigen Experimenten wie in **A**. Die durch  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Li^+$  bzw.  $NH_4^+$  getragenen Ströme wurden aus der Differenz zwischen dem in Gegenwart von NMDG gemessenen und dem in Gegenwart von  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Li^+$  bzw.  $NH_4^+$  beobachteten Strom bestimmt. Die Ströme wurden auf den NMDG-sensitiven  $Na^+$ -Strom normiert. Die Anzahl der jeweils durchgeführten Experimente ist über jeder Säule angegeben, senkrechte Balken geben die SEM an.

(Abb. 7A), wobei der NMDG-sensitive Strom wiederholt bestimmt wurde. Der Wechsel von  $\text{Na}^+$  zu  $\text{K}^+$  erhöhte den MTX-stimulierten Einwärtsstrom leicht, während der Wechsel von  $\text{Na}^+$  zu  $\text{Li}^+$  ihn leicht erniedrigte. Der Wechsel von  $\text{Na}^+$  zu  $\text{NH}_4^+$  provozierte eine zweiphasige Antwort mit einer anfänglichen Spitze eines Einwärtsstroms, der eine niedrigere Plateauphase folgte. Während der Plateauphase war der beobachtete Einwärtsstrom in Gegenwart von  $\text{NH}_4^+$  immer noch beträchtlich höher als in Gegenwart von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  oder  $\text{Li}^+$ . Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 7B zusammengefaßt, in der die Größe der MTX-stimulierten Einwärtsströme in Gegenwart unterschiedlicher einwertiger Kationen verglichen wird. Die Kationenströme werden relativ zu dem in Gegenwart von NMDG bestimmten Strom angegeben und sind auf den unmittelbar vor und nach dem Wechsel zu einem anderen Kation gemessenen  $\text{Na}^+$ -Strom standardisiert. Wie in Abb. 7B gezeigt, unterscheidet die MTX-stimulierte Leitfähigkeit kaum zwischen Alkaliionen und zeigt eine leichte Präferenz für  $\text{NH}_4^+$  mit der folgenden Leitfähigkeitssequenz:  $\text{NH}_4^+$  (2,1) >  $\text{K}^+$  (1,5) >  $\text{Na}^+$  (1,0) >  $\text{Li}^+$  (0,7).

#### *Effekte zweiwertiger Kationen*

In Experimenten wie in Abb. 8A wurde überprüft, ob der MTX-stimulierte Strom auch durch die zweiwertigen Kationen  $\text{Mn}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$  aufrecht erhalten werden kann. Das Versuchsprotokoll war das gleiche wie in den Versuchen zur Selektivität für einwertige Kationen. Nach der Stimulation eines NMDG-sensitiven Einwärtsstroms durch MTX wurden in der Phase der langsamen Rückbildung die  $\text{Na}^+$ -Ionen im Bad (115 mM) durch  $\text{Mn}^{2+}$ - bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (je 57,5 mM) ersetzt.  $\text{Mn}^{2+}$  führte zu einer ähnlichen Abnahme des Einwärtsstroms wie NMDG (n=10). Das bedeutet, daß die aktivierten Kanäle eine sehr geringe, kaum meßbare Leitfähigkeit für  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen haben. Die Substitution von  $\text{Na}^+$  durch  $\text{Ca}^{2+}$  hingegen verursachte eine komplexere Antwort (n=13). Während der ersten 20-30 s wurde eine kurze Erhöhung des Einwärtsstroms mit unterschiedlicher Ausprägung beobachtet. Wie in Abb. 8A zu sehen, lief diese Erhöhung typischerweise in zwei Phasen ab, mit einer initialen Stromspitze, die von einem sekundären, langsamen und vorübergehenden Anstieg gefolgt wurde. In einigen Experimenten wurde nur eine einzelne oder eine doppelte Stromspitze beobachtet (Abb. 8B). Im Anschluß daran gingen die Ströme innerhalb von  $3,3 \pm 0,3$  min annähernd auf null zurück (n=12). Diese Abnahme des Einwärtsstroms erfolgte beträchtlich schneller und war vollständiger als die spontane Rückbildung, die nach dem Auswaschen von MTX in  $\text{Na}^+$ -Badlösung zu beobachten war (vgl.



**Abb. 8** Effekt zweiwertiger Kationen auf den MTX-aktivierten Einwärtsstrom. **A** zeigt die repräsentative Stromaufzeichnung von einer Oozyte nach kurzer Exposition (ca. 10 s, nicht gezeigt) gegenüber  $5 \cdot 10^{-10}$  M MTX. Durch Austausch von  $\text{Na}^+$  im Bad durch  $\text{Mn}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$  (wie angegeben) wurden die Effekte von zweiwertigen Kationen auf den MTX-aktivierten Strom untersucht. **B**: Bei einer durch MTX ( $10^{-9}$  M) stimulierten Oozyte (Exposition: 30 Sekunden (nicht gezeigt)) wurde  $\text{Na}^+$  im Bad zunächst in Gegenwart von Nifluminsäure ( $10^{-4}$  M) durch  $\text{Ca}^{2+}$  ersetzt. Nach einer weiteren Stimulation durch MTX wurde der Versuch wiederholt, diesmal in Abwesenheit von Nifluminsäure. In **A** und **B** waren die Oozyten auf  $-60$  mV geklemmt, der MTX-stimulierte Einwärtsstrom wurde durch wiederholtes Austauschen von  $\text{Na}^+$  im Bad durch NMDG dokumentiert.

Abb. 5). Wenn die Nulllinie einmal erreicht war, führte der Wechsel von  $\text{Ca}^{2+}$  zurück zu  $\text{Na}^+$  im Bad nicht mehr zu einem starken Anstieg des Einwärtsstroms, wie nach dem Wechsel von  $\text{Mn}^{2+}$  zu  $\text{Na}^+$  in entsprechenden Experimenten beobachtet worden war (Abb. 8A). Außerdem war die NMDG-sensitive Stromkomponente wieder klein und fast auf den Wert wie unter Kontrollbedingungen zurückgekehrt ( $n=12$ ). Das läßt vermuten, daß die Exposition gegenüber hohen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen die MTX-induzierte Aktivierung des Stromes auslöscht. Nach Auswaschen der  $\text{Ca}^{2+}$ -reichen Lösung rief die erneute Zugabe von MTX in Gegenwart von  $\text{Na}^+$  dieselbe Stromerhöhung wie unter Kontrollbedingungen hervor ( $n=9$ ) (Abb. 8B).

In dem in Abb. 8B dargestellten Experiment wurde geprüft, ob die initiale vorübergehende Stromerhöhung nach dem Wechsel von einer  $\text{Na}^+$ - zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -reichen Badlösung durch  $\text{Cl}^-$ -Kanäle hervorgerufen wurde. Diese könnten dann möglicherweise durch  $10^{-4}$  M Nifluminsäure, einen bekannten Blocker  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{Cl}^-$ -Kanäle, inhibiert werden. Wie in Abb. 8B dargestellt, unterdrückte Nifluminsäure diese initiale Stromantwort nicht

(n=7), was gegen eine Beteiligung Nifluminsäure-sensitiver Cl-Kanäle spricht. Kontrollversuche an Oozyten, die nicht mit MTX stimuliert worden waren, zeigten, daß der Austausch von Na<sup>+</sup> durch Mn<sup>2+</sup> (n=6) oder Ca<sup>2+</sup> (n=10) den Einwärtsstrom um ungefähr denselben Betrag verringerte wie der Ersatz von Na<sup>+</sup> durch NMDG. Eine zweiphasige Antwort auf Ca<sup>2+</sup>, wie sie nach MTX-Stimulation gesehen worden war, blieb unter Kontrollbedingungen aus (n=10). Diese Experimente lassen vermuten, daß die Permeabilität der Oozytenmembran für zweiwertige Kationen unter Kontrollbedingungen sehr niedrig ist.

### Wirkung von Hemmstoffen

Um die durch MTX stimulierte nichtselektive Kationenleitfähigkeit genauer zu beschreiben, wurde ihre Sensitivität für verschiedene Hemmstoffe, die bekanntermaßen andere nichtselektive Kationenkanäle blockieren, untersucht. Tabelle 2 faßt die Ergebnisse dieser Experimente zusammen. Die Applikation von 1 mM Amilorid, einem Hemmstoff mechanosensitiver Kationenkanäle und ATP-induzierter Na<sup>+</sup>-Ströme in *Xenopus laevis* Oozyten [Lane et al. (1991); Kupitz & Atlas (1993)], hemmte in Gegenwart von 115 mM Na<sup>+</sup> im Bad den MTX-induzierten Einwärtsstrom um 62±2 % (n=13). Wie in Abb. 9A dargestellt, zeigte Amilorid ähnliche Effekte in Gegenwart von Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Die Werte der entsprechenden Experimente sind in Abb. 9B zusammengefaßt. Sie zeigt die durchschnittliche durch Amilorid verursachte Hemmung des MTX-induzierten Einwärtsstroms in Gegenwart unterschiedlicher Kationen. Die Daten bestätigen, daß die durch diese unterschiedlichen Kationen getragenen Ströme durch dieselben nichtselektiven Kationenkanäle fließen.

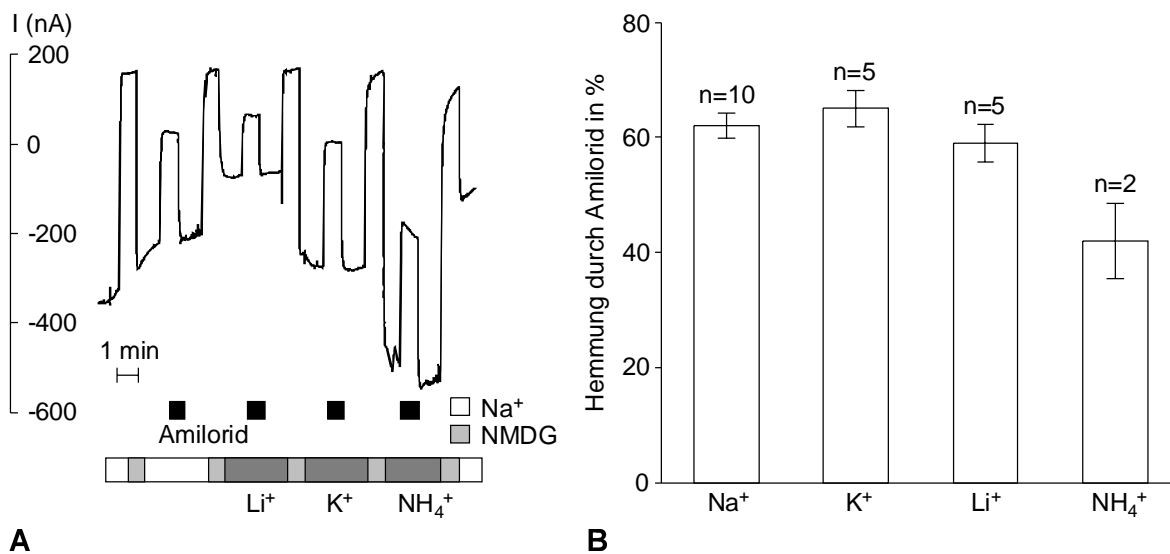
Hemmstoff	Konz. (M)	Hemmung (%)	n
Benzamil	10 <sup>-3</sup>	81±4 **	3
	10 <sup>-4</sup>	33±1 ***	3
	10 <sup>-5</sup>	2±1 n.s.	3
Amilorid	10 <sup>-3</sup>	62±2 ***	13
	10 <sup>-4</sup>	12±0 ***	3
SK&F 96365	10 <sup>-4</sup>	65±4 ***	4
	10 <sup>-5</sup>	1±5 n.s.	2
Gadolinium	10 <sup>-4</sup>	38±3 ***	5
	10 <sup>-5</sup>	29±2 ***	5
Flufenaminsäure	10 <sup>-4</sup>	1±4 n.s.	3
Nifluminsäure	10 <sup>-4</sup>	0±0 n.s.	5
DCDPC	10 <sup>-4</sup>	0±0 n.s.	5
LOE908	10 <sup>-5</sup>	0±0 n.s.	4

**Tab. 2** Auswirkungen von Hemmstoffen auf den MTX-aktivierten Einwärtsstrom (nach Weber (1999))

n.s.: nicht signifikant verschieden von Kontrolle.

\*\* bzw. \*\*\*: signifikant verschieden von Kontrolle mit p<0,01 bzw. p<0,001





**Abb. 9** Effekt von Amilorid auf den MTX-aktivierten Einwärtsstrom in Gegenwart von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> bzw. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. **A** zeigt eine repräsentative Stromaufzeichnung von einer Oozyte, die während 7 min mit einer MTX-Konzentration von 10<sup>-11</sup> M stimuliert worden war (nicht abgebildet). Der Effekt von Amilorid (Ami) in einer Konzentration von 10<sup>-3</sup> M (schwarze Balken) wurde in Gegenwart verschiedener Kationen überprüft (dunkelgraue Balken). Die Oozyte war auf -60 mV geklemmt, der MTX-aktivierte Einwärtsstrom wurde durch wiederholtes Austauschen von Na<sup>+</sup> im Bad durch NMDG dokumentiert. In **B** sind die Daten von zehn gleichartigen Experimenten zusammengefaßt. Angegeben ist die durchschnittliche prozentuale Hemmung der durch Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> bzw. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> getragenen Ströme durch Amilorid. Die durch Amilorid (10<sup>-3</sup> M) hemmbare Einwärtsstromkomponente wurde standardisiert auf die NMDG-sensitive Einwärtsstromkomponente. Die Anzahl der jeweils durchgeführten Experimente ist über jeder Säule angegeben, senkrechte Balken geben die SEM an.

Benzamil, ein Amiloridanalogen, das den durch MTX verursachten Einstrom von <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> in 3T3 Zellen und den durch MTX verursachten Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> in HL-60 Zellen hemmt [Daly et al. (1995)], zeigte die stärkste Wirkung mit einer Hemmung um 81 % bei einer Konzentration von 1 mM. SK&F 96365, das als Hemmsubstanz für den rezeptorvermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom [Merritt et al. (1990)] und für nichtselektive Kationenkanäle [Krautwurst et al. (1992)] beschrieben wurde und das die Effekte von MTX in vielen verschiedenen Zellarten hemmt, blockierte in der vorliegenden Arbeit den MTX-induzierten Strom in einer Konzentration von 100 µM um 65 %. Gd<sup>3+</sup>, von dem gezeigt wurde, daß es dehnungsaktivierte nichtselektive Kationenkanäle [Yang & Sachs (1989)] und eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit in *Xenopus laevis* Oozyten [Cougnon et al. (1996)] hemmt, hatte einen inhibitorischen Effekt von 29 % bei einer Konzentration von 10 µM bzw. von 38 % bei einer Konzentration von 100 µM. Flufenaminsäure, ein Hemmstoff vieler nichtselektiver Kationenkanäle [Gögelein et al. (1990)], der z.B. schrumpfungsaktivierte nichtselektive Kationenkanäle in M-1 Zellen aus dem kortikalen Sammelrohr der Maus

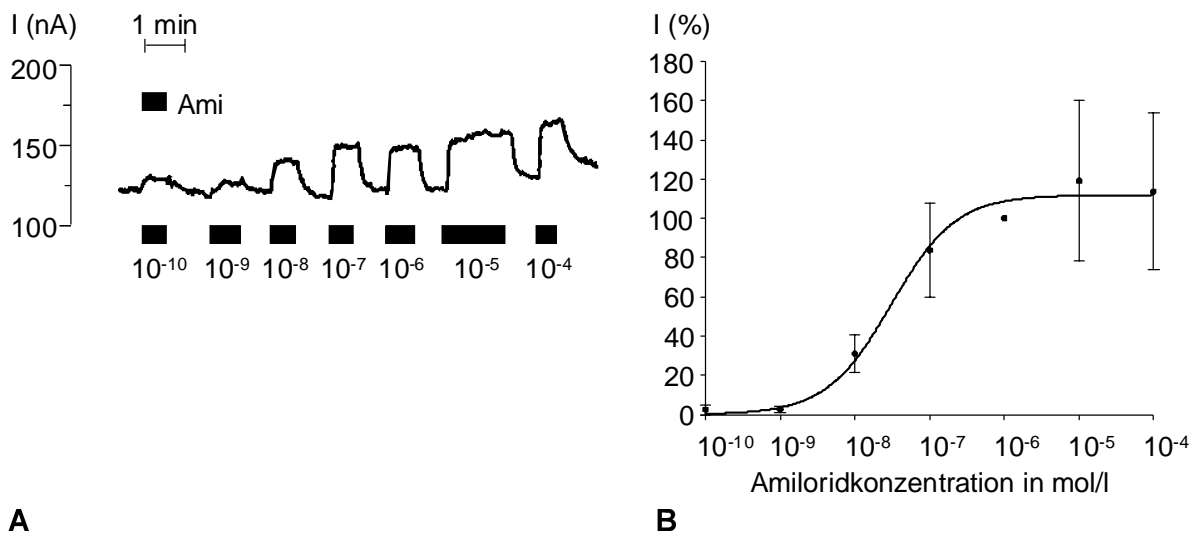
hemmt [Volk et al. (1995)] und auch einen MTX-aktivierten nichtselektiven Kationenkanal in L-Zellen von Mäusen blockiert [Estacion et al. (1996)], hatte keine Wirkung auf den MTX-aktivierten Einwärtsstrom in diesen Experimenten. Desgleichen zeigten zwei chemisch verwandte Verbindungen – Nifluminsäure, die einen nichtselektiven Kationenkanal im exokrinen Pankreas der Ratte hemmt [Gögelein et al. (1990)] und DCDPC, das eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit in *Xenopus laevis* Oozyten hemmt [Cougnon et al. (1996)] – keinen signifikanten inhibitorischen Effekt. LOE 908, ein weiterer Blocker nichtselektiver Kationenkanäle [Krautwurst et al. (1993)], war in einer Konzentration von 10  $\mu$ M wirkungslos.

## II. AMILORID-SENSITIVE EPITHELIALE NATRIUMKANÄLE

### *Expression des epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals der Ratte ( $\alpha\beta\gamma$ -rENaC) in *Xenopus laevis* Oozyten*

Gegenwärtig wird angenommen, daß der epitheliale Na<sup>+</sup>-Kanal der Ratte aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ -rENaC,  $\beta$ -rENaC,  $\gamma$ -rENaC) in der Zusammensetzung 2 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1 $\gamma$  besteht [Firsov et al. (1998); Kosari et al. (1998)]. Nachfolgend wird der epitheliale Na<sup>+</sup>-Kanal, der sich nach der Injektion gleicher cRNA-Mengen von  $\alpha$ -rENaC,  $\beta$ -rENaC und  $\gamma$ -rENaC in der Oozytenmembran ausbildet und der vermutlich die gleiche Zusammensetzung von Untereinheiten aufweist (2 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1 $\gamma$ ), vereinfachend als  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC bezeichnet. Die gleiche Bezeichnung wird auch für die entsprechende cRNA-Mischung ( $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ =1:1:1) verwendet. Die Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten führte in 349 Versuchen zur Ausbildung eines Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms von 900 $\pm$ 60 nA (p<0,001). Dieser Wert stimmt gut mit den Ergebnissen von Canessa et al. (1994) überein.

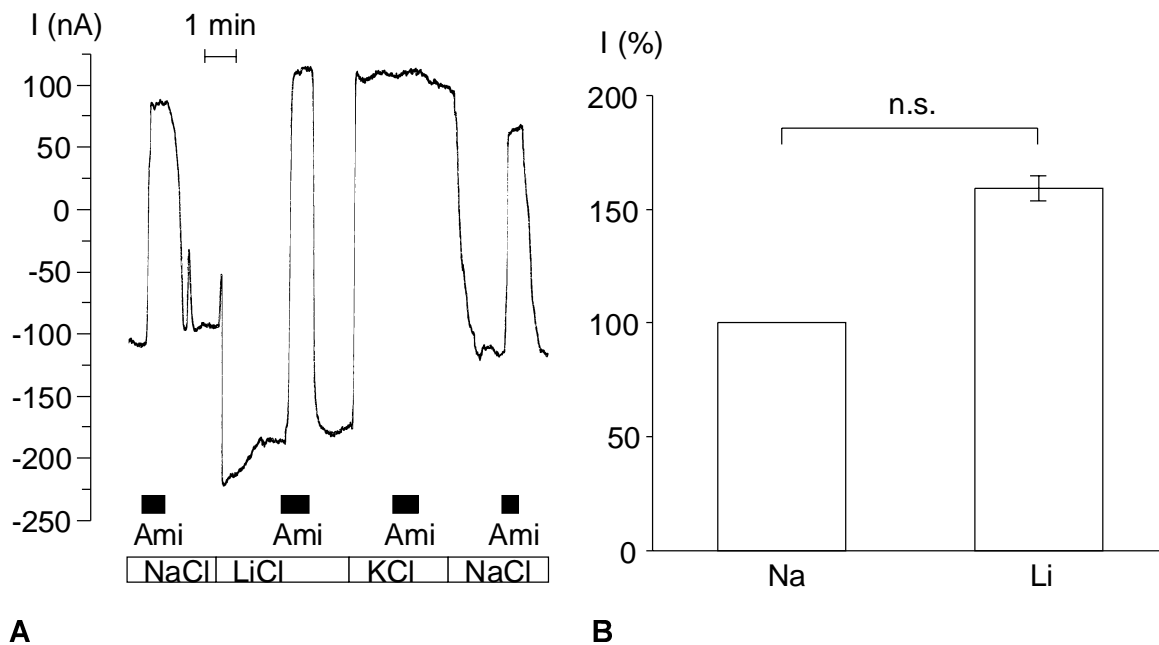
Da Amilorid – wie oben beschrieben – auch den MTX-stimulierten endogenen Einwärtsstrom der Oozyten hemmt, und zwar bei 10<sup>-3</sup> M um 60 % und bei 10<sup>-4</sup> M immerhin noch um 12 %, wurde zunächst die Konzentrationsabhängigkeit der Amiloridwirkung untersucht, um sicherzustellen, daß durch Gabe von Amilorid nur der Strom blockiert wurde, der durch ENaC getragen wird. Nach Canessa et al. (1994) hemmt Amilorid den epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanal bereits in submikromolaren Konzentrationen mit einer IC<sub>50</sub> von 1,04\*10<sup>-7</sup> M, so daß keine Überlappung zu befürchten war. Wie Abb. 10 zeigt, ließ sich diese Erwartung bestätigen. An Oozyten, denen  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA injiziert worden war, ergab sich eine IC<sub>50</sub> von 3\*10<sup>-8</sup> M (n=6), und aus dem Kurvenverlauf von Abb. 10B kann



**Abb. 10** Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung durch Amilorid nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA. **A** zeigt eine Stromaufzeichnung von einer auf  $-60$  mV geklemmten Oozyte nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA. Die schwarzen Balken zeigen die Zugabe von Amilorid zum Bad in ansteigender Konzentration von  $10^{-10}$  M bis  $10^{-4}$  M an. Die Amilorid-sensitive Einwärtsstromkomponente wurde aus der Differenz zwischen dem Gesamtstrom Abwesenheit und nach Zugabe von Amilorid zum Bad errechnet. **B**: Die Amilorid-sensitiven Einwärtsströme aus ähnlichen Experimenten wie in **A** wurden auf den Amilorid-sensitiven Strom bei  $10^{-6}$  M Amilorid standardisiert und sind gegen die Konzentration von Amilorid ( $10^{-10}$  M bis  $10^{-4}$  M) aufgetragen. Das Michaelis-Menten Diagramm zeigt eine  $IC_{50}$  von  $3 \cdot 10^{-6}$  M. Die einzelnen Punkte stellen Durchschnittswerte von sechs Versuchen dar. Senkrechte Balken geben die SEM an.

man schließen, daß  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC bereits durch Konzentrationen von  $10^{-6}$  M bis  $10^{-5}$  M vollständig gehemmt wird. Damit ist eine Interferenz von nichtselektiven  $Na^+$ -Kanälen praktisch ausgeschlossen. In den weiteren Versuchen wurde, wenn nicht anders angegeben, deshalb Amiloridlösung in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-6}$  M verwendet.

Um eventuelle Überlappungen mit anderen endogenen  $Na^+$ -Kanälen festzustellen, wurde zudem die Kationenselektivität der Amilorid-inhibierbaren Ströme von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA injizierten Oozyten untersucht. Abb. 11A zeigt die Aufzeichnung eines solchen Experiments. In Gegenwart von  $Na^+$  beträgt die Amilorid-sensitive Einwärtsstromkomponente ca. 200 nA. Beim Wechsel von  $Na^+$  zu  $Li^+$  im Bad nimmt der Einwärtsstrom in die Zelle deutlich zu. Hinzufügen von Amilorid zur Badlösung zeigt, daß diese Zunahme des Einwärtsstroms auf einer Zunahme der Amilorid-sensitiven Stromkomponente beruht. Bei Wechsel von  $Li^+$  zu  $K^+$  kehrt der Strom um und nimmt in etwa den gleichen Betrag an, den er unter Amilorid hatte. Der Strom durch  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC ist also gehemmt. Entsprechend zeigt die Zugabe von Amilorid zur Badlösung jetzt keine Wirkung mehr.



**Abb. 11** Selektivität des Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA für Kationen. **A** zeigt eine repräsentative Stromaufzeichnung von einer auf  $-60$  mV geklemmten Oozyte nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA. Die schwarzen Balken zeigen die Zugabe von Amilorid zum Bad in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-6}$  M an. Die Kationenselektivität der Amilorid-sensitiven Einwärtsstromkomponente wurde getestet, indem  $\text{Na}^+$  im Bad durch unterschiedliche Kationen ausgetauscht wurde, wie unter der Aufzeichnung angegeben. **B**: Zusammenfassung der Ergebnisse von sechs gleichartigen Experimenten wie in **A**. Die Hemmung der durch  $\text{Na}^+$  bzw.  $\text{Li}^+$  getragenen Amilorid-sensitiven Einwärtsstromkomponente wurde aus der Differenz zwischen dem Strom in Abwesenheit und dem Strom in Gegenwart von Amilorid in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-6}$  M im Bad bestimmt und auf den Amilorid-sensitiven Einwärtsstrom unter  $\text{Na}^+$  im Bad standardisiert. Der senkrechte Balken gibt die SEM an. n.s.: Werte sind nicht signifikant unterschiedlich ( $p > 0,05$ ).

Der Wechsel von  $\text{K}^+$  zu  $\text{Na}^+$  führt wieder auf ungefähr denselben Stromwert wie zu Beginn des Experimentes. In sechs gleichartigen Experimenten ergab sich zusammengefaßt eine hohe Selektivität für  $\text{Na}^+$  und  $\text{Li}^+$  mit einer Präferenz für  $\text{Li}^+$  ( $\text{Li}^+/\text{Na}^+ = 1,59 \pm 0,05$ ,  $n=6$ ) und praktisch keiner Durchlässigkeit für  $\text{K}^+$  (s. Abb. 11B). Offensichtlich ist der heterolog exprimierte  $\text{Na}^+$ -Kanal hochselektiv für  $\text{Na}^+$  und hochsensitiv für Amilorid. Ein ähnlicher Kanal ist in Kontrollloozyten nicht nachweisbar. Die unterschiedliche Kationenselektivität und die Hemmwirkung von Amilorid in mikromolarer Konzentration erlaubt es, den heterolog exprimierten epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal klar von dem durch MTX-stimulierten endogenen nichtselektiven Kationenkanal zu unterscheiden und ihn als Strom durch typische epitheliale  $\text{Na}^+$ -Kanäle zu identifizieren.

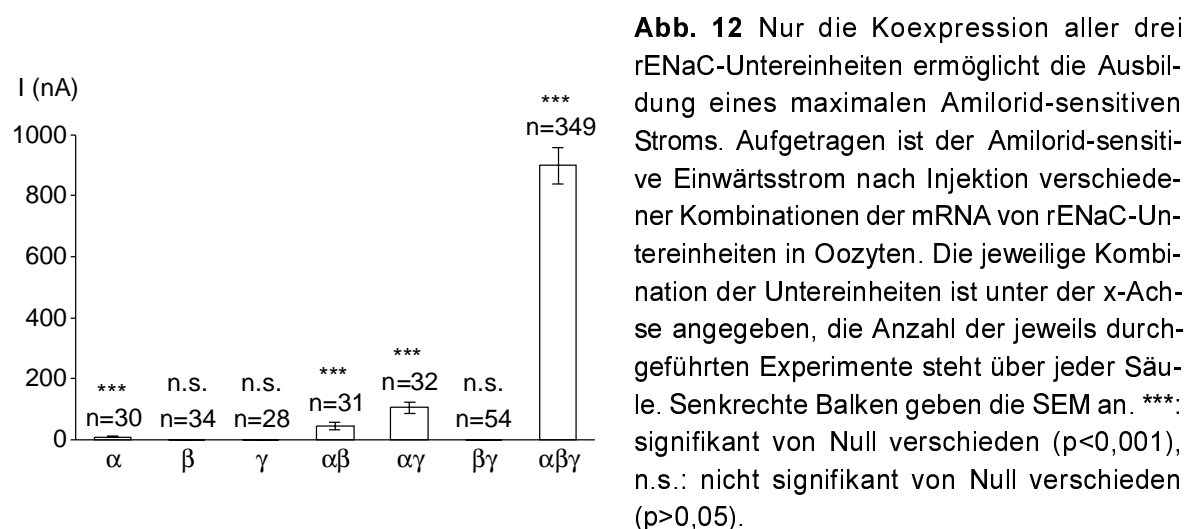
### Expression verschiedener Kombinationen von $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -rENaC

Obwohl man davon ausgeht, daß der voll funktionsfähige rENaC aus drei Untereinheiten gebildet wird [Firsov et al. (1996)], wurde beschrieben, daß manche Epithelien nur eine oder zwei Untereinheiten von rENaC konstant exprimieren und dennoch funktionierende  $\text{Na}^+$ -Kanäle ausbilden können [Lingueglia et al. (1994); Asher et al. (1996); Farman et al. (1997)].

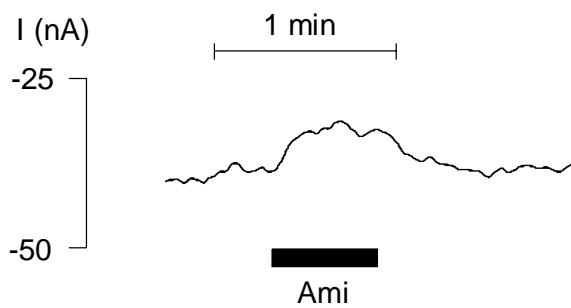
In Abb. 12 sind die Ergebnisse von Versuchen dargestellt, die diese Aussage bestätigen. Danach führt die Injektion von  $\beta$ - oder  $\gamma$ -rENaC cRNA allein oder zusammen ( $\beta\gamma$ -rENaC) nicht zu einem signifikanten Amilorid-sensitiven Strom; es wurden lediglich  $0,2 \pm 0,10$  nA ( $n=34$ ,  $p>0,05$ ) und  $0,14 \pm 0,14$  nA ( $n=28$ ,  $p>0,05$ ) bzw.  $0,28 \pm 0,14$  nA ( $n=54$ ,  $p>0,05$ ) gemessen. Dagegen führte die Injektion von  $\alpha$ -rENaC cRNA allein sowie die Injektion der Zweierkombinationen  $\alpha\beta$ - und  $\alpha\gamma$ -rENaC cRNA zu signifikanten Amilorid-sensitiven Einwärtsströmen, die für  $\alpha$  bei  $10 \pm 2,2$  nA ( $n=30$ ,  $p<0,001$ ), für  $\alpha\beta$  bei  $46 \pm 11$  nA ( $n=31$ ,  $p<0,001$ ) und für  $\alpha\gamma$  bei  $107 \pm 19$  nA ( $n=32$ ,  $p<0,001$ ) lagen. Erst die Injektion aller drei Untereinheiten führte zur Ausbildung maximaler Amilorid-sensitiver Ströme, die wie oben bereits genannt ca. 900 nA betragen.

### Vergleich von $\alpha\beta\gamma$ -rENaC mit $\text{Na}^+$ -Kanälen, die aus M-1 mRNA exprimiert wurden

Oozyten, in die M-1 Poly(A)<sup>+</sup> RNA injiziert wurde, zeigten unter den oben beschriebenen Bedingungen einen sehr kleinen aber von null signifikant verschiedenen Amilorid-



**Abb. 12** Nur die Koexpression aller drei rENaC-Untereinheiten ermöglicht die Ausbildung eines maximalen Amilorid-sensitiven Stroms. Aufgetragen ist der Amilorid-sensitiven Einwärtsstrom nach Injektion verschiedener Kombinationen der mRNA von rENaC-Untereinheiten in Oozyten. Die jeweilige Kombination der Untereinheiten ist unter der x-Achse angegeben, die Anzahl der jeweils durchgeführten Experimente steht über jeder Säule. Senkrechte Balken geben die SEM an. \*\*\*: signifikant von Null verschieden ( $p<0,001$ ), n.s.: nicht signifikant von Null verschieden ( $p>0,05$ ).



**Abb. 13** Expression von M-1 mRNA in Oozyten führt zur Ausbildung eines Amilorid-sensitiven Stroms. Repräsentative Stromaufzeichnung von einem Experiment nach Injektion von M-1 mRNA. Die Oozyte ist auf -60 mV geklemmt. Der schwarze Balken zeigt die Gabe von Amilorid in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-6}$  M zum Bad an.

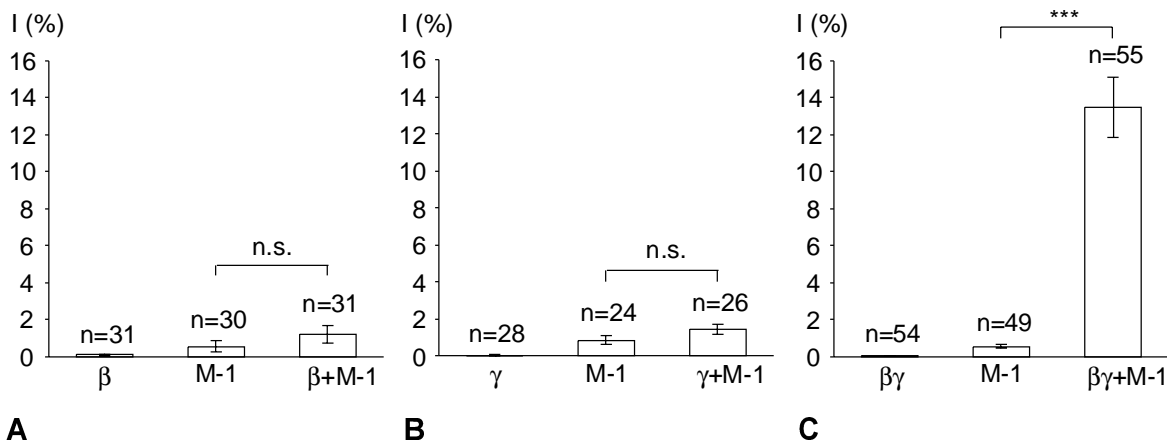
sensitiven Einwärtsstrom von  $3,2 \pm 0,50$  nA ( $n=174$ ,  $p < 0,001$ ). Die Hemmkonstante für Amilorid wurde hier nicht bestimmt. Da diese Experimente aber mit  $2 \mu\text{M}$  Amilorid durchgeführt wurden (Abb. 13), ist davon auszugehen, daß die exprimierten Kanäle eine ähnlich hohe Amiloridempfindlichkeit besitzen wie die oben beschriebenen heterolog exprimierten  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC. In der Tat wurde in mit Wasser injizierten ( $n=31$ ) und in nichtinjizierten ( $n=8$ ) Kontrolloozyten nie ein solcher Amilorid-sensitiver Strom beobachtet. Da der Amilorid-sensitive Strom nach Injektion von M-1 mRNA in Oozyten sehr klein war, war es mit der Technik der Zwei-Elektroden Spannungsklemme nicht möglich, die Selektivität des exprimierten Ionenkanals zu untersuchen. *Patch-Clamp* Untersuchungen an M-1 Zellen zeigten jedoch, daß die in diesen Zellen beobachtete Amilorid-sensitive Leitfähigkeit hochselektiv für  $\text{Na}^+$  gegenüber  $\text{K}^+$  ist, mit einer leichten Präferenz für  $\text{Li}^+$  gegenüber  $\text{Na}^+$  [Letz et al. (1995)]. Die Expression von M-1 Poly(A)<sup>+</sup> RNA dürfte somit zur Insertion von Kanälen führen, die die gleichen Eigenschaften besitzen wie Kanäle nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA.

#### *Koexpressionsexperimente von M-1 mRNA und $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA*

Da das Ausmaß der Expression der in die Oozyten injizierten RNA an den verschiedenen Versuchstagen stark variierte, wurden die absoluten Stromwerte auf den jeweiligen Tagesmittelwert der Stromwerte in den mit  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC injizierten Oozyten normiert. In den folgenden Abschnitten sind deshalb die Stromwerte nicht nur in nA sondern auch in Prozent des jeweiligen Tagesmittelwertes von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC injizierten Oozyten angegeben.

#### *Koinjektion von $\beta$ - und $\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA*

Abb. 14A-C faßt Experimente zusammen, in denen  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA exprimiert werden sollte.



**Abb. 14** Koexpression von M-1 mRNA mit  $\beta$ -,  $\gamma$ - oder  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA in Oozyten. Alle Ströme sind auf den jeweiligen Tagesmittelwert des Amilorid-sensitiven Stroms in Oozyten nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA standardisiert. **A** zeigt den standardisierten Amilorid-sensitiven Strom nach Injektion von  $\beta$ -rENaC cRNA und M-1 mRNA. Die Kombinationen der injizierten RNA sind unter der x-Achse angegeben. Die Anzahl der jeweils durchgeführten Experimente steht über jeder Säule. Senkrechte Balken geben die SEM an. n.s.: Werte sind nicht signifikant unterschiedlich ( $p > 0,05$ ). **B** zeigt das entsprechende Diagramm nach Injektion von  $\gamma$ -rENaC cRNA und M-1 mRNA. **C** zeigt den standardisierten Amilorid-sensitiven Strom nach Injektion von  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA. \*\*\*: Werte signifikant voneinander verschieden ( $p < 0,001$ ).

Die Injektion von  $\beta$ -rENaC cRNA führte zur Ausbildung eines nicht signifikant von null verschiedenen Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms ( $0,2 \pm 0,10$  nA bzw.  $0,08 \pm 0,05$  %,  $n=34$ ). Der Amilorid-sensitive Einwärtsstrom nach alleiniger Injektion von M-1 mRNA war sehr klein ( $1,0 \pm 0,47$  nA bzw.  $0,54 \pm 0,3$  %,  $n=30$ ) und unterschied sich nicht signifikant von dem Strom nach Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\beta$ -rENaC cRNA ( $2,2 \pm 0,57$  nA bzw.  $1,2 \pm 0,48$  %,  $n=31$ ).

Auch die nach Injektion von  $\gamma$ -rENaC cRNA beobachtete durch Amilorid hemmbare Stromkomponente ( $0,14 \pm 0,14$  nA bzw.  $0,03 \pm 0,03$  %,  $n=28$ ) war nicht signifikant von null verschieden und unterschied sich deutlich von der Stromkomponente, die in dieser Versuchsreihe nach alleiniger Injektion von M-1 mRNA beobachtet wurde ( $2,5 \pm 0,69$  nA bzw.  $0,8 \pm 0,25$  %,  $n=24$ ). Die Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\gamma$ -rENaC cRNA führte zu einem Amilorid-sensitiven Einwärtsstrom ( $4,3 \pm 0,76$  nA bzw.  $1,5 \pm 0,28$  %,  $n=26$ ), der sich nicht signifikant von dem beobachteten Strom nach Injektion von M-1 mRNA allein unterschied.

Der Amilorid-sensitive Einwärtsstrom nach Injektion von  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA ( $0,28 \pm 0,14$  nA bzw.  $0,05 \pm 0,03$  %,  $n=54$ ) war nicht signifikant. Injektion von M-1 mRNA führte in dieser

Versuchsreihe wieder zur Ausbildung eines kleinen Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms ( $4,3 \pm 0,88$  nA bzw.  $0,56 \pm 0,13$  %,  $n=49$ ). Die Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA bewirkte jedoch einen 24-fachen Anstieg des Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms auf  $97 \pm 12,8$  nA bzw.  $13,5 \pm 1,65$  % ( $n=55$ ) im Vergleich zur alleinigen Injektion von M-1 mRNA (s.o.). Dies läßt vermuten, daß die Kombination der cRNA der  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC-Untereinheiten mit  $\alpha$ -ENaC Untereinheiten aus der M-1 mRNA zur Expression zahlreicher kompletter  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC führt; und das würde darauf hindeuten, daß die  $\alpha$ -rENaC Untereinheit in M-1 Zellen im Vergleich zu den beiden anderen überproportional exprimiert wird.

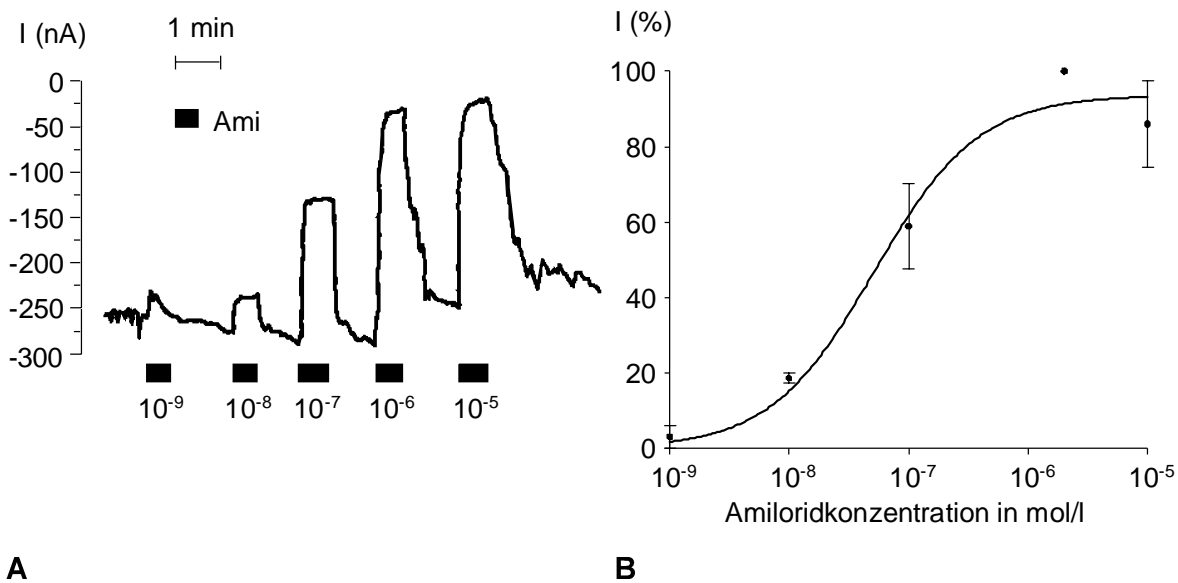
#### *Hemmwirkung von Amilorid auf den aus M-1 mRNA und $\beta\gamma$ -rENaC cRNA zusammengesetzten ENaC*

Um zu untersuchen, ob die Koinjektion von M-1 mRNA mit der  $\beta$ - und der  $\gamma$ -rENaC Untereinheit möglicherweise zur Expression von Ionenkanälen führt, die sich von  $\alpha\beta\gamma$  rENaC hinsichtlich der Amilorid-Empfindlichkeit unterscheiden, wurde die Hemmwirkung von Amilorid bei aufsteigenden Amiloridkonzentrationen von  $10^{-9}$  M bis  $10^{-5}$  M bestimmt. In Abb. 15A ist ein Experiment wiedergegeben, in dem die hemmende Wirkung von Amilorid auf den  $\text{Na}^+$ -Einwärtsstrom bei Amiloridkonzentrationen von  $10^{-9}$  M bis  $10^{-5}$  M gemessen wurde. Das Michaelis-Menten Diagramm in Abb. 15B zeigt in der Zusammenfassung ähnlicher Experimente, daß der aus M-1 mRNA und  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA zusammengesetzte  $\text{Na}^+$ -Kanal mit einer  $\text{IC}_{50}$  von  $5,1 \cdot 10^{-8}$  M in etwa dieselbe Amilorid-Sensitivität aufweist wie  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC (s.o. und [Canessa et al. (1994)]:  $1,0 \cdot 10^{-7}$  M).

#### *Selektivität des ENaC nach Injektion von M-1 mRNA und $\beta\gamma$ -rENaC cRNA*

Um zu überprüfen, ob die durch M-1 mRNA +  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA exprimierten Ionenkanäle dieselben Selektivitätseigenschaften aufweisen wie  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC, wurden Experimente an Oozyten durchgeführt, denen M-1 mRNA und  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA injiziert worden war. Wie oben beschrieben wurde das  $\text{Na}^+$  in der Badlösung wieder durch  $\text{Li}^+$  bzw.  $\text{K}^+$  ersetzt. In dem in Abb. 16A wiedergegebenen Experiment stieg die Amilorid-sensitive Stromkomponente in Gegenwart von  $\text{Li}^+$  um 210 % gegenüber dem Wert in  $\text{Na}^+$  an, während der Wechsel von  $\text{Na}^+$  zu  $\text{K}^+$  zum völligen Erliegen des Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms führte. Aus weiteren Experimenten dieser Art ergab sich eine mittlere Erhöhung der Einwärtsstromkomponente beim Wechsel von  $\text{Na}^+$  zu  $\text{Li}^+$  um  $184 \pm 16$  % ( $n=10$ ;  $p < 0,001$ ),



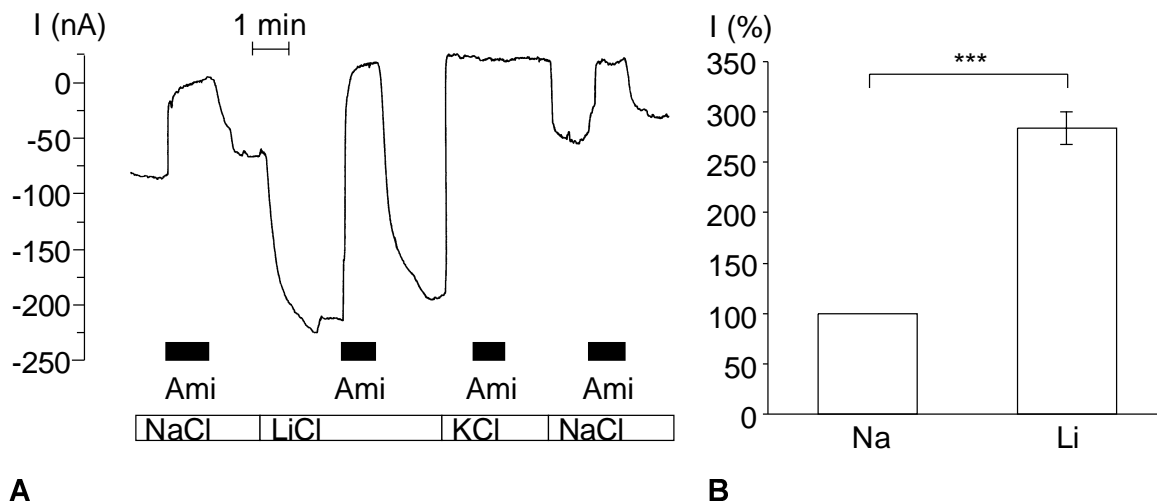


**Abb. 15** Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung durch Amilorid nach Koinjektion von  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA. **A** zeigt eine repräsentative Stromaufzeichnung von einer auf  $-60$  mV geklemmten Oozyte nach Injektion von M-1 mRNA mit  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA. Die schwarzen Balken zeigen die Zugabe von Amilorid zum Bad in aufsteigenden Konzentrationen von  $10^{-9}$  M bis  $10^{-5}$  M an. Die Amilorid-sensitive Einwärtsstromkomponente wurde aus der Differenz zwischen dem Gesamtstrom in Abwesenheit und nach Zugabe von Amilorid zum Bad errechnet. **B**: Die Amilorid-sensitiven Einwärtsströme aus ähnlichen Experimenten wie in **A** wurden auf den Amilorid-sensitiven Strom bei  $10^{-6}$  M Amilorid standardisiert und sind gegen die Konzentration von Amilorid ( $10^{-9}$  M bis  $10^{-5}$  M) aufgetragen. Das Michaelis-Menten Diagramm zeigt eine  $IC_{50}$  von  $5,1 \cdot 10^{-8}$  M. Die einzelnen Punkte stellen Durchschnittswerte von drei Experimenten dar. Senkrechte Balken geben die SEM an.

s. Abb. 16B. Diese Präferenz für  $Li^+$  ist deutlich höher als in Oozyten, die  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC ( $59 \pm 5$  %,  $n=6$ , s.o.) exprimierten. Das bedeutet, daß die  $\beta\gamma$ -rENaC Untereinheiten im Zusammenspiel mit M-1 RNA einen voll funktionsfähigen, aber vermutlich hinsichtlich der Kationenselektivität leicht modifizierten  $Na^+$ -Kanal ausbilden.

#### Koinjektion von M-1 mRNA mit $\alpha$ -, $\alpha\beta$ - oder $\alpha\gamma$ -rENaC cRNA

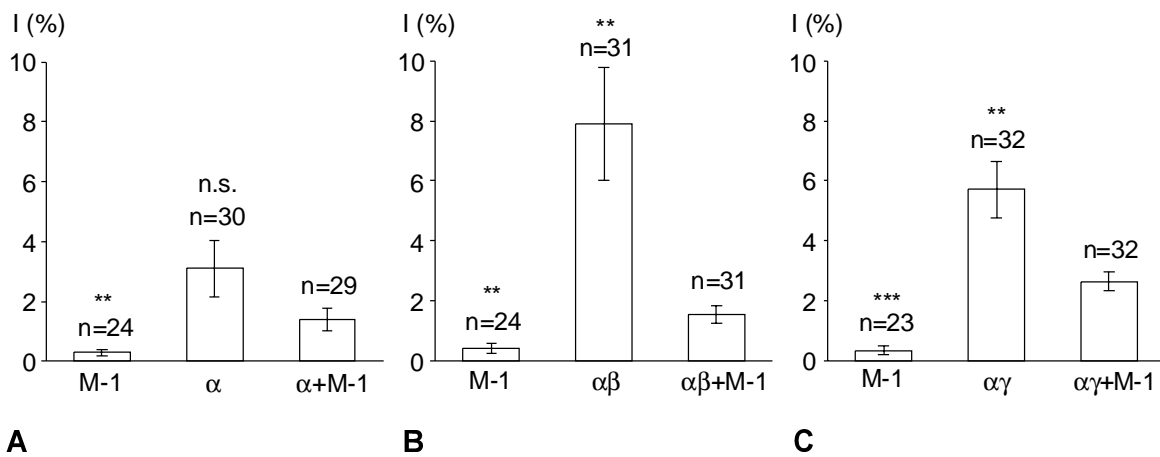
Die alleinige Injektion von  $\alpha$ -rENaC cRNA führte zur Expression eines kleinen Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms ( $10 \pm 2,2$  nA bzw.  $3,1 \pm 0,95$  %,  $n=30$ ). Dieser Strom war deutlich größer als der nach alleiniger Injektion von M-1 mRNA ( $1,8 \pm 0,61$  nA bzw.  $0,3 \pm 0,11$  %,  $n=24$ ). Nach Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\alpha$ -rENaC cRNA war der Amilorid-sensitive Einwärtsstrom jedoch etwas niedriger ( $5,4 \pm 0,94$  nA bzw.  $1,4 \pm 0,37$  %,  $n=29$ ) als nach alleiniger Injektion von  $\alpha$ -rENaC cRNA. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant. (Abb. 17A)



**Abb. 16** Selektivität des Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms nach Koinjektion von  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA für Kationen. **A** zeigt eine repräsentative Stromaufzeichnung von einer auf  $-60$  mV geklemmten Oozyte nach Injektion von M-1 mRNA und  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA. Die schwarzen Balken zeigen die Zugabe von Amilorid zum Bad in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-6}$  M an. Die Kationenselektivität der Amilorid-sensitiven Einwärtsstromkomponente wurde getestet, indem  $\text{Na}^+$  im Bad durch unterschiedliche Kationen ausgetauscht wurde, wie unter der Aufzeichnung angegeben. **B**: Zusammenfassung der Ergebnisse von zehn gleichartigen Experimenten wie in **A**. Die Hemmung der durch  $\text{Na}^+$  bzw.  $\text{Li}^+$  getragenen Amilorid-sensitiven Einwärtsstromkomponente wurde aus der Differenz zwischen dem Strom in Abwesenheit und dem Strom in Gegenwart von Amilorid in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-6}$  M im Bad bestimmt und auf den Amilorid-sensitiven Einwärtsstrom unter  $\text{Na}^+$  im Bad standardisiert. Der senkrechte Balken gibt die SEM an. \*\*\*: Werte signifikant voneinander verschieden ( $p < 0,001$ ).

Ähnliche Beobachtungen wurden mit  $\alpha\beta$ -rENaC gemacht. Nach Injektion von  $\alpha\beta$ -rENaC cRNA wurde ein Amilorid-sensitiver Strom von  $46 \pm 11$  nA bzw.  $7,9 \pm 1,90$  % ( $n=31$ ) gemessen, der sich deutlich von dem Strom unterschied, den mit M-1 mRNA injizierte Oozyten aufwiesen ( $2,6 \pm 0,98$  nA bzw.  $0,4 \pm 0,16$  %,  $n=24$ ). Nach Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\alpha\beta$ -rENaC cRNA war der durch Amilorid hemmbare Strom jedoch signifikant kleiner ( $p < 0,01$ ) und betrug nur noch etwa ein Fünftel des nach Injektion von  $\alpha\beta$ -rENaC cRNA gemessenen Stroms ( $9,7 \pm 1,80$  nA bzw.  $1,6 \pm 0,29$  %,  $n=31$ ) (Abb. 17B).

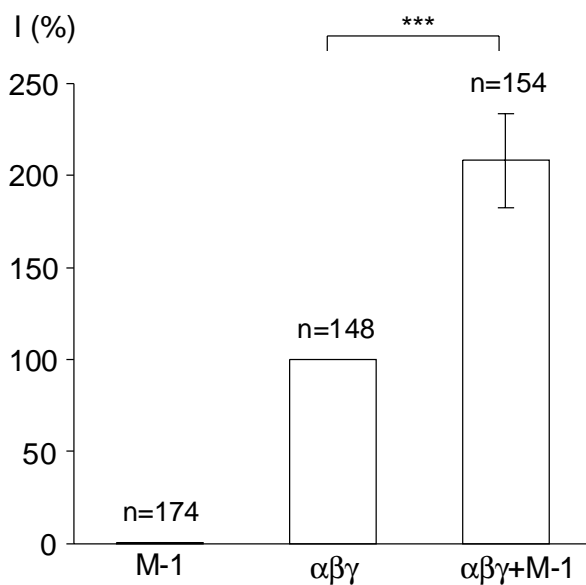
Des Weiteren wurden Experimente nach Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\alpha\gamma$ -rENaC cRNA durchgeführt. Oozyten, denen  $\alpha\gamma$ -rENaC allein injiziert worden war, bildeten einen deutlichen Amilorid-sensitiven Einwärtsstrom aus ( $107 \pm 19$  nA bzw.  $5,7 \pm 0,95$  %,  $n=32$ ). Kontrollexperimente mit alleiniger Injektion von M-1 mRNA ergaben einen Strom von  $6,4 \pm 2,79$  nA bzw.  $0,3 \pm 0,14$  %,  $n=23$ . Auch hier kam es nach Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\alpha\gamma$ -rENaC cRNA zu einer signifikanten Verkleinerung des Einwärtsstroms ( $50 \pm 5,9$  nA bzw.  $2,6 \pm 0,31$  %,  $n=32$ ,  $p < 0,01$ ) gegenüber alleiniger Injektion von  $\alpha\gamma$ -rENaC (Abb. 17C).



**Abb. 17** Koexpression von M-1 mRNA mit  $\alpha$ -,  $\alpha\beta$ - oder  $\alpha\gamma$ -rENaC cRNA in Oozyten. Alle Ströme sind auf den jeweiligen Tagesmittelwert des Amilorid-sensitiven Stroms in Oozyten nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA standardisiert. **A** zeigt den standardisierten Amilorid-sensitiven Strom nach Injektion von  $\alpha$ -rENaC cRNA und M-1 mRNA. Die Kombinationen der injizierten RNA sind unter der x-Achse angegeben. Die Anzahl der jeweils durchgeführten Experimente steht über jeder Säule. Senkrechte Balken geben die SEM an. \*\*: Werte signifikant voneinander verschieden ( $p < 0.01$ ); n.s.: Werte sind nicht signifikant unterschiedlich ( $p > 0.05$ ). **B** zeigt das entsprechende Diagramm nach Injektion von  $\alpha\beta$ -rENaC cRNA und M-1 mRNA. **C** zeigt den standardisierten Amilorid-sensitiven Strom nach Injektion von  $\alpha\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA. \*\*\*: Werte signifikant voneinander verschieden ( $p < 0.001$ ).

#### Koinjektion von cRNA aller drei rENaC Untereinheiten mit M-1 mRNA

Im Vergleich zum Amilorid-sensitiven Einwärtsstrom nach Injektion aller drei rENaC-Untereinheiten ( $980 \pm 100$  nA bzw. 100 %,  $n=148$ ) führte die Koinjektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA aber nicht etwa zu einem Abfall, sondern zu einem Anstieg des Amilorid-sensitiven Stroms auf ungefähr das Doppelte ( $1470 \pm 167$  nA bzw.  $208 \pm 25$  %,  $n=154$ )



**Abb. 18** Koexpression von M-1 mRNA mit  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA in Oozyten. Alle Ströme sind auf den Amilorid-sensitiven Einwärtsstrom nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA normiert. Die jeweils exprimierte RNA ist unterhalb der x-Achse angegeben. Die Anzahl der jeweils durchgeführten Experimente steht über jeder Säule. Senkrechte Balken geben die SEM an. \*\*\*: Werte sind signifikant unterschiedlich ( $p < 0.001$ ).

(Abb. 18).<sup>1</sup> Dieser Anstieg des Amilorid-sensitiven Stroms nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA in Kombination mit M-1 mRNA könnte darauf hinweisen, daß M-1 mRNA eventuell eine weitere Komponente des epithelialen Natriumkanals oder mRNA für eine regulatorische Untereinheit des Kanals beinhaltet.

Zusammenfassend ist für die Experimente mit Koinjektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA folgendes festzustellen: Die Koinjektion von  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA führt zur Ausbildung eines vielfach größeren Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms als die Injektion von  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA oder von M-1 mRNA allein. Im Gegensatz dazu führt die Koinjektion von  $\alpha$ -,  $\alpha\beta$ - oder  $\alpha\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA zu einer Verkleinerung des Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms gegenüber der jeweiligen cRNA-Kombination allein. Schließlich ist der Amilorid-sensitive Einwärtsstrom nach Koinjektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA deutlich größer als nach alleiniger Injektion der drei rENaC-Untereinheiten.

---

<sup>1</sup>Hier scheinen sich die absoluten und die normierten Werte des Amilorid-sensitiven Stroms zu widersprechen. Obwohl der gemittelte Absolutwert des Amilorid-sensitiven Stroms nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA + M-1 mRNA nur etwa 50 % größer ist, als der des Amilorid-sensitiven Stroms nach alleiniger Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA, geben die normierten Mittelwerte eine Steigerung des Amilorid-sensitiven Stroms von über 100 % nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA + M-1 mRNA gegenüber dem Strom nach alleiniger Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA an. Die Statistik umfaßt Werte von zwölf Versuchstagen. An einem Versuchstag war der mittlere Amilorid-sensitive Strom nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA relativ niedrig (187 nA), während der mittlere Amilorid-sensitive Strom nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA + M-1 mRNA ähnliche Werte wie an anderen Versuchstagen annahm (1600 nA). Dadurch kam es bei einer nicht sehr großen absoluten Differenz zwischen den Werten zu einer sehr großen relativen Differenz von 750 %. Im wesentlichen ist es dieser aus dem Mittel der übrigen Versuchstage ausbrechende Wert, der zu der scheinbaren Diskrepanz zwischen den absoluten und den normierten Werten führte.

---

## Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene durch Amilorid hemmbare Kationenkanäle untersucht. Bei dem ersten handelt es sich um den endogenen MTX-aktivierten nicht-selektiven Kationenkanal in *Xenopus laevis* Oozyten. Der zweite untersuchte Kationenkanal (ENaC) ist hochselektiv für  $\text{Na}^+$  und stammt aus dem kortikalen Sammelrohr der Maus bzw. dem Rattenkolon. Er wurde nach Injektion der jeweiligen mRNA bzw. cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert.

### I. NICHTSELEKTIVE MTX-AKTIVIERTE KATIONENKANÄLE IN *XENOPUS LAEVIS* OOZYTEN

Die entscheidenden Beobachtungen des ersten Teil dieser Arbeit sind folgende: 1) Messungen des Ruhemembranpotentials ( $V_m$ ) zeigten, daß MTX die Oozyten depolarisiert und daß diese Depolarisierung von  $\text{Na}^+$  abhängig ist; 2) Messungen des transmembranären Stroms zeigten, daß MTX eine starke einwärts gerichtete Stromkomponente induziert, die von  $\text{Na}^+$  getragen ist; 3) Experimente mit Substitution der Kationen offenbarten, daß die aktivierten Einwärtsströme auch von  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Li}^+$  getragen sein können. In ihrer Summe zeigen diese Befunde, daß MTX nichtselektive Kationenkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten aktiviert. Nachfolgend wird diskutiert werden, in welcher Beziehung die MTX-aktivierte Leitfähigkeit zu früher beschriebenen Ionenleitfähigkeiten in *Xenopus laevis* Oozyten steht und wie MTX seine Wirkung entfaltet.

*Welche nichtselektiven Kationenkanäle werden durch MTX in *Xenopus laevis* Oozyten aktiviert?*

Aus Einzelkanal-*Patch-clamp*-Untersuchungen ist bekannt, daß *Xenopus laevis* Oozyten endogene nichtselektive Kationenkanäle besitzen [Methfessel et al. (1986); Yang & Sachs (1990); Lane et al. (1991)]. Diese Kanäle sind in der Regel stumm, können aber durch Dehnung der Membran (z.B. durch Erhöhung des hydrostatischen Drucks in der *Patch*-Pipette) aktiviert werden. Die physiologische Bedeutung dieser Kanäle und ihr Aktivierungsmechanismus sind noch unbekannt. Es fragt sich nun, ob diese Kanäle eventuell durch MTX aktiviert werden und für die hier beobachteten Ströme verantwortlich sind.

Die Selektivitätsabstufung aus Einzelkanalleitfähigkeitsmessungen ( $\text{K}^+$ : 1,4;  $\text{Na}^+$ : 1;  $\text{Li}^+$ : 0,6 [Yang & Sachs (1990)]) stimmt gut mit der Abstufung der Selektivität für Alkalikationen überein, die hier in Ganzzell-Strommessungen an der Oozyte bestimmt wurde:  $\text{K}^+$  (1,5) >

$\text{Na}^+$  (1) >  $\text{Li}^+$  (0,7). Dehnungsaktivierte nichtselektive Kationenkanäle mit ähnlicher Selektivität für Alkalikationen wurden kürzlich ebenfalls in Studien an *Rana* Oozyten [Taglietti & Toselli (1988)] und Seeigeleiern [Lii et al. (1996)] beschrieben. Unterschiede scheinen aber hinsichtlich der Permeabilität von  $\text{NH}_4^+$  zu bestehen. In der vorliegenden Arbeit waren die MTX-stimulierten Einwärtsströme in Gegenwart von  $\text{NH}_4^+$  ungefähr 40 % größer als in Gegenwart von  $\text{K}^+$ . Demgegenüber war die Einzelkanalleitfähigkeit der dehnungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten in Gegenwart von  $\text{NH}_4^+$  und in Gegenwart von  $\text{K}^+$  fast gleich. Sie betrug 76 pS bzw. 78 pS [Yang & Sachs (1990)].

Diese letzteren Befunde ließen sich mit den vorliegenden Beobachtungen in Einklang bringen, wenn die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle in Gegenwart von  $\text{NH}_4^+$  ansteigen würde. Viele Kanäle zeigen eine potentialabhängige Offenwahrscheinlichkeit, in dem Sinn, daß Depolarisation die Offenwahrscheinlichkeit erhöht, und Applikation von  $\text{NH}_4^+$  im Bad führt in der Tat zu einer transienten Depolarisation der Oozyte [Cougnon et al. (1996)]. Eine depolarisationsabhängige Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit kann die hier beobachtete Selektivität für  $\text{NH}_4^+$  über  $\text{K}^+$  aber nicht erklären, weil die vorliegenden Befunde alle unter den Bedingungen der Spannungsklemme, d.h. bei konstantem Potential erhoben wurden. Andererseits erinnert die schnelle transiente Depolarisation, die in Zellpotentialmessungen beobachtet wurde, an die initiale Stromspitze, die in der vorliegenden Arbeit nach dem Wechsel von  $\text{Na}^+$  zu  $\text{NH}_4^+$  auftrat. Die Ursache dieses transienten Effekts von  $\text{NH}_4^+$  ist noch unklar. Die initiale Stromspitze könnte aber über einen lokalen (submembranären) Anstieg des intrazellulären pH oder der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zustandekommen [Burckhardt & Frömter (1992); Cougnon et al. (1996)]. In einer jüngeren Studie wird angenommen, daß  $\text{NH}_4^+$  selbst eine Leitfähigkeit für  $\text{Na}^+$  und  $\text{NH}_4^+$  in *Xenopus laevis* Oozyten aktiviert [Burckhardt & Burckhardt (1997)].

Wie die vorangegangene Diskussion gezeigt hat, ist das Ergebnis der Selektivitätsmessungen mit  $\text{NH}_4^+$  noch nicht eindeutig zu bewerten. Sieht man deshalb von den Experimenten mit  $\text{NH}_4^+$  ab, so zeigt der Literaturvergleich, daß die MTX-aktivierten nichtselektiven Kationenströme sehr wohl durch die dehnungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanäle hervorgerufen sein könnten, die von anderen Arbeitsgruppen in der Oozytenmembran beobachtet wurden.

Diese Schlußfolgerung wird auch durch die Experimente mit diversen Hemmstoffen gestützt. So werden sowohl dehnungsaktivierte als auch die hier beschriebenen MTX-aktivierten nichtselektiven Kationenkanäle durch millimolare Konzentrationen von Amilorid effektiv blockiert [Lane et al. (1991)]. Amilorid sowie sein Derivat Benzamil, das die MTX-aktivierten Kanäle in den vorliegenden Experimenten sogar noch stärker hemmte, sind als spezifische Hemmstoffe des epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals ENaC (s.u.) bekannt. Sie hemmen aber (in höheren Dosen) auch eine Reihe von mehr oder weniger selektiven Natrium- bzw. Kationenkanälen, so z.B. im distalen Lungenepithel von Rattenfeten [Marunaka (1996)] oder im medullären Sammelrohr der Ratte [Light et al. (1988)]. Außerdem hemmen sie einen ATP-aktivierten Natriumkanal in der Oozytenmembran, der offenbar nicht mit dem dehnungsaktivierten oder dem MTX-aktivierten nichtselektiven Kationenkanal identisch ist. Die Hemmkonstante des ATP-aktivierten Kationenkanals für Amilorid liegt bei 2 µM [Kupitz & Atlas (1993)], während die des dehnungsaktivierten Kationenkanals bei 0,5 mM liegt [Lane et al. (1991)]. Ein weiterer Hinweis auf die Identität oder zumindest große Ähnlichkeit von MTX-aktivierter Leitfähigkeit und dehnungsaktivierter nichtselektiver Kationenleitfähigkeit folgt aus den Experimenten mit Gd<sup>3+</sup>. Gd<sup>3+</sup> hemmt beide, die MTX-induzierte Leitfähigkeit und die dehnungsaktivierten Einzelkanäle, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. So wurde der MTX-induzierte Einwärtsstrom in den hier durchgeführten Experimenten durch 100 µM Gd<sup>3+</sup> nur teilweise gehemmt, wohingegen die dehnungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanäle in *outside-out Patches* durch 10 µM Gd<sup>3+</sup> vollständig blockiert wurden [Yang & Sachs (1989)]. Zusammenfassend lassen die ähnliche Selektivität für einwertige Kationen und das ähnliche Hemmerprofil vermuten, daß die MTX-aktivierte nichtselektive Kationenleitfähigkeit und die dehnungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten möglicherweise identisch oder zumindest sehr ähnlich und möglicherweise genetisch nahe verwandt sind.

In einer Studie aus jüngster Zeit wurde eine Hemmung der MTX-aktivierten nichtselektiven Kationenleitfähigkeit durch hohe extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen nachgewiesen [Weber (1999)]. Dieser Befund spricht ebenfalls für die Beteiligung endogener dehnungsaktivierter nichtselektiver Kationenkanäle an der durch MTX aktivierten Leitfähigkeit, da diese Kanäle in *Xenopus laevis* Oozyten ebenfalls durch hohe extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen gehemmt werden [Yang & Sachs (1989)].

*MTX stimuliert den Kalziumeinstrom*

MTX erhöht die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in unterschiedlichen Zellarten einschließlich *Xenopus laevis* Oozyten. Dies kann entweder durch die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kationenkanälen oder durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung aus intrazellulären Speichern geschehen [Bernard et al. (1988); Soergel et al. (1992); Gusovsky et al. (1993); Dietl & Völkl (1994); Daly et al. (1995); Leech & Habener (1997)]. Es stellt sich also die Frage, ob die MTX-aktivierten nichtselektiven Kationenkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten durchlässig für  $\text{Ca}^{2+}$  sind.

Um zu prüfen, ob nichtselektive Kationenkanäle für zweiwertige Kationen durchlässig sind, wird häufig  $\text{Mn}^{2+}$  benutzt. Es kann viele nichtselektive Kationenkanäle ebensogut permeieren wie  $\text{Ca}^{2+}$ . Wenn  $\text{Mn}^{2+}$  in die Zelle eindringt, löscht es in mikrospektrofluorometrischen Untersuchungen, in denen Fura-2 als  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikator benutzt wird, die Fluoreszenz. So wurde z.B. in Insulinomzellen beobachtet, daß  $\text{Mn}^{2+}$  in die Zelle eindringt, nachdem nichtselektive Kationenkanäle durch MTX stimuliert worden waren. Dies wurde als Nachweis dafür gewertet, daß MTX-stimulierte nichtselektive Kationenkanäle durchlässig sind für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen [Leech & Habener (1997)]. In den vorliegenden Experimenten verminderte der Austausch von  $\text{Na}^+$ -Ionen im Bad gegen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen oder  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen vor der Applikation von MTX den Einwärtsstrom auf ungefähr dieselbe Höhe wie der Ersatz von  $\text{Na}^+$  durch das nicht permeierende Kation NMDG. Dies deutet an, daß die Permeabilität der Oozyten für zweiwertige Kationen unter Kontrollbedingungen niedrig ist. Nach der Applikation von MTX reduzierte der Austausch von  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{Mn}^{2+}$  im Bad den Einwärtsstrom immer noch auf ungefähr denselben Wert wie NMDG. Die Durchlässigkeit für  $\text{Mn}^{2+}$  blieb also so niedrig, daß keine makroskopischen von  $\text{Mn}^{2+}$  getragenen Ströme beobachtet werden konnten.

Im Gegensatz zu  $\text{Mn}^{2+}$  trat bei Ersatz allen  $\text{Na}^+$  durch  $\text{Ca}^{2+}$  zunächst ein vergleichsweise sehr hoher transienter Einwärtsstrom (initiale Stromspitze) auf, der etwa 5 bis 30 s andauerte und meistens von einer zweiten kleineren Stromspitze gefolgt wurde. Danach kehrte der Strom relativ rasch ungefähr auf den Basisspiegel zurück, der auch bei Ersatz allen  $\text{Na}^+$  durch NMDG beobachtet wurde.



Welche Ionenflüsse dieser komplexen Stromantwort zugrunde liegen und durch welche Kanäle die einzelnen Stromkomponenten fließen, ist in diesem Augenblick nicht eindeutig zu entscheiden. Wegen der Höhe der initialen Stromspitze ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch MTX-stimulierte nichtselektive Kationenkanäle eher unwahrscheinlich. Yang & Sachs (1989, 1990) haben zwar in Einzelkanalmessungen gefunden, daß die dehnungsaktivierten nichtselektiven Kationenkanäle von Oozyten, die vermutlich die MTX-aktivierten Ströme hindurchfließen lassen, auch für  $\text{Ca}^{2+}$  permeabel sind, nach Ersatz allen  $\text{Na}^+$  durch  $\text{Ca}^{2+}$  fiel aber die Einzelkanalleitfähigkeit von 54 auf 15 pS ab [Yang & Sachs (1990)], und die Offenzeit verkürzte sich von 2,9 auf 0,5 ms [Yang & Sachs (1989)], was einer Reduktion der Leitfähigkeit auf ca. 5 % entspräche. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch diese Kanäle sollte deshalb selbst angesichts des höheren elektrochemischen Gradienten eher kleiner sein als der vorausgehende  $\text{Na}^+$ -Einstrom. Andererseits können auch nicht meßbar kleine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf der zytoplasmatischen Oberfläche der Zellmembran so weit ansteigen lassen [Neher (1992)], daß  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerte Kanäle für andere Ionen geöffnet werden, und diese könnten dann die komplexe Stromantwort bewirken. Hier kommen neben  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in erster Linie  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerte  $\text{Cl}^-$ -Kanäle in Betracht, die in vielen Zellen zu finden sind und auch an Oozyten von *Xenopus laevis* nachgewiesen wurden [Barish (1983); Dascal (1987)]. Die Beobachtung, daß der  $\text{Cl}^-$ -Kanalblocker Nifluminsäure die initiale Stromspitze nach Ersatz von  $\text{Na}^+$  durch  $\text{Ca}^{2+}$  nicht unterdrücken konnte, mag zwar gegen  $\text{Cl}^-$ -Kanäle sprechen, die sogenannten  $\text{Cl}^-$ -Kanalblocker sind aber in vielen Geweben nicht oder nur in extrem hohen Konzentrationen wirksam, so daß die fehlende Wirkung von Nifluminsäure mit Vorsicht interpretiert werden muß.

In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung von Interesse, daß Benzamil und SK&F 96365 den MTX-aktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom an unterschiedlichen Zellsystemen hemmen [Soergel et al. (1992); Gusovsky et al. (1993); Daly et al. (1995); Leech & Habener (1997)]. Dies würde erklären, weshalb in Gegenwart dieser Inhibitoren die initiale Stromkomponente deutlich reduziert war, kann aber zwischen der Interpretation der initialen Stromspitze als transientem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom oder transientem  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom nicht differenzieren.

Eine unerwartete Beobachtung war die relativ schnelle Abnahme der MTX-stimulierten Einwärtsströme während Badperfusion mit einer hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Wurde nach vollständiger Deaktivierung dieser Stromkomponente das  $\text{Ca}^{2+}$  im Bad wieder durch  $\text{Na}^+$  ersetzt, so blieb auch der Wiederanstieg des Einwärtsstroms aus, der sonst (z.B. in Gegenwart von  $\text{Mn}^{2+}$ ) regelmäßig beobachtet wurde. Dies weist daraufhin, daß die MTX-aktivierten nichtselektiven Kationenkanäle durch  $\text{Ca}^{2+}$  langsam gehemmt werden, oder daß der Aktivierungsmechanismus durch  $\text{Ca}^{2+}$  unterbrochen wird, so daß die Kanäle in ihren inaktiven Ausgangszustand zurückkehren. Letztere Vorstellung wäre gut mit der Beobachtung von Weber (1999) vereinbar, wonach MTX in Gegenwart hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (40 mM) im Bad keine Kanalaktivierung mehr bewirkt. Wie  $\text{Ca}^{2+}$  die Aktivierung verhindert oder rückgängig macht, läßt sich zur Zeit jedoch nicht sagen.

#### *Mögliche Mechanismen der Kanalaktivierung durch MTX*

Grundsätzlich gibt es drei mögliche Mechanismen, über die MTX eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit in *Xenopus laevis* Oozyten aktivieren könnte: 1) MTX selbst könnte in die Membran eingebaut werden und eine ionenleitende Pore bilden; 2) MTX könnte mit stummen Kanälen, die sich in der Zellmembran befinden, direkt interagieren und diese Kanäle über eine Konformationsänderung des Kanalproteins aktivieren, wie es für ligandengesteuerte Ionenkanäle angenommen wird; 3) MTX könnte über die Aktivierung intrazellulärer Signalwege wiederum die Aktivierung von Ionenkanälen in der Plasmamembran oder deren Einbau in die Membran vermitteln.

Die erste der drei Möglichkeiten ist unwahrscheinlich, da mehrere Studien gezeigt haben, daß MTX keine Ionenkanaleigenschaften besitzt [Takahashi et al. (1983); Murata et al. (1992); Dietl & Völkl (1994)]. Die zweite Möglichkeit läßt sich nicht einfach ausschlagen. So wurde vor kurzem berichtet, daß nichtselektive Kationenkanäle in exzidierten *inside/out* und *outside/out Patches* von MDCK Zellen (einer renalen Epithelzelllinie) durch Zugabe von MTX zur Pipetten- oder Badlösung direkt aktiviert werden können [Dietl & Völkl (1994)]. In derselben Studie wurde in Ganzzellexperimenten gezeigt, daß die Kanalaktivierung von einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gefolgt wurde. Diese Befunde legen nahe, daß MTX nichtselektive Kationenkanäle direkt aktiviert und daß der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eher Folge als Ursache dieser Kanalaktivierung ist [Dietl & Völkl (1994)]. Außerdem wurde gezeigt, daß die Aktivierung

nichtselektiver Kationenkanäle durch MTX von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängt [Weber (1999)], was auf eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Interaktion zwischen MTX und den betroffenen Ionenkanälen hinweisen könnte. Gegen eine direkte Interaktion sprechen allerdings Befunde an Insulinomzellen, wonach Genistein die MTX-stimulierte nichtselektive Kationenleitfähigkeit hemmt, was auf eine Beteiligung von Tyrosinkinase bei der Kanalaktivierung hinweisen könnte [Leech & Habener (1997)]. Überdies geht der durch MTX verursachte Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in einer Vielzahl von Systemen mit der Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und mit Änderungen des Membranpotentials einher.

Für die dritte Möglichkeit spricht der Zeitverlauf der Stromaktivierung durch MTX: Der verzögerte Beginn und der relativ langsame Anstieg des Kationenstroms, der sich nur langsam zurückbildete, paßt gut zum Modell einer sekundären Kanalaktivierung (über eine intrazelluläre Signalkaskade). Demgegenüber sollte eine direkte Aktivierung durch MTX-Bindung mit Konformationsänderung des Kanalproteins eher zu einem schnellen Anstieg des MTX-induzierten Stroms mit anschließender Plateauphase (oder gegebenenfalls anschließender Desensibilisierung des Kanals) führen. Hinzu kommt, daß MTX in *Xenopus laevis* Oozyten sowohl die Bildung von Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) als auch einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die Exozytose von submembranären Vesikeln bewirkt [Bernard et al. (1988)]. Dies könnte bedeuten, daß nichtselektive Kationenkanäle in submembranären Vesikeln vorhanden sind und nach Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran in diese eingebaut werden könnten. Tatsächlich wurde kürzlich gezeigt, daß Stimulation mit MTX zu einer Zunahme der Membrankapazität (Vergrößerung der Membranoberfläche) führt [Weber (1999)].

Damit ist die dritte Alternative, d.h. eine indirekte (metabotrope) Kanalaktivierung durch MTX am wahrscheinlichsten. Welche Zwischenstufen involviert sind, läßt sich aber im Augenblick noch nicht mit Sicherheit feststellen.

#### *Physiologische Bedeutung des MTX-aktivierten nichtselektiven Kationenkanals in Xenopus laevis Oozyten*

Die Aktivierung nichtselektiver Kationenkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten hat zumindest zwei physiologisch bedeutsame Effekte: Erstens führt sie zu einer Membran-

depolarisation, deren Rolle vermutlich darin besteht, während der Frühphase der Fertilisation das Eindringen mehrerer Spermien (Polyspermie) zu verhindern [Grey et al. (1982)]. Zweitens führt sie höchstwahrscheinlich zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und löst damit auf die Fertilisation folgende Umwandlungsprozesse der Oozyte aus. Dabei muß die Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht unmittelbar durch die Öffnung der nichtselektiven Kationenkanäle hervorgerufen sein, sondern könnte auch sekundär durch Aktivierung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle hervorgerufen werden, zumal die Existenz solcher Kanäle in *Xenopus laevis* Oozyten nachgewiesen wurde [Bernard et al. (1988)]. Eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist offenbar eine unabdingbare Voraussetzung für viele der weiteren Umwandlungsprozesse (wie die Exozytose submembranärer Vesikel, kortikale Kontraktionen und die Bildung der Teilungsfurche), die der Befruchtung folgen [Kline (1988); Bement & Capco (1990)]. Tatsächlich ahmt MTX in *Xenopus laevis* Oozyten die Antwort auf eine Befruchtung nach, was auf der durch MTX bewirkten Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration beruhen könnte [Bernard et al. (1988)].

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Daten vermuten, daß die MTX-aktivierten nichtselektiven Kationenkanäle mit den dehnungsaktivierten Kanälen identisch oder genetisch verwandt sind und daß diese Kanäle eine Rolle spielen bei der Auslösung der zellulären Reaktionen von *Xenopus laevis* Oozyten, die der Befruchtung folgen.

## II. AMILORID-SENSITIVE EPITHELIALE NATRIUMKANÄLE

Der hier untersuchte epitheliale  $\text{Na}^+$ -Kanal (ENaC) ist charakteristischerweise hochsensitiv gegenüber Amilorid mit einer mittleren Hemmkonzentration von Amilorid von  $3 \cdot 10^{-8}$  M. Dadurch unterscheidet er sich klar von dem im ersten Teil dieser Arbeit untersuchten MTX-aktivierten nichtselektiven Kationenkanal, der durch Amilorid in Konzentrationen von 1 mM lediglich zu 60 % gehemmt wird. Ein weiterer endogener Kationenkanal in *Xenopus laevis* Oozyten kann bereits durch 10  $\mu\text{M}$  Amilorid gehemmt werden, unterscheidet sich aber von ENaC dadurch, daß er durch keines der beiden Amiloridderivate Benzamil und Phenamil hemmbar ist [Weber et al. (1995)]. Amilorid kann also mehrere Ionenkanäle hemmen, in Konzentrationen unter 10  $\mu\text{M}$  kann es jedoch als selektiver Hemmer des epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals (ENaC) angesehen werden [Canessa et al. (1995)]. Da in allen Experimenten des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit nur Strom-

komponenten betrachtet wurden, die durch Amiloridkonzentrationen von  $\leq 10 \mu\text{M}$  blockiert wurden, ist sichergestellt, daß es sich bei den hier untersuchten heterolog exprimierten (exogenen) Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Kanälen um ENaC handelt. Eine Verwechslung mit endogenen Kationenkanälen von *Xenopus laevis* Oozyten ist ausgeschlossen.

#### *Koexpression von M-1 mRNA und $\beta\gamma$ -rENaC cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten*

Es ist bekannt, daß in vielen Organen die mRNA einer oder zweier Untereinheiten des normalerweise aus drei Untereinheiten zusammengesetzten ENaC überwiegt, während die verbleibenden Untereinheiten in Abhängigkeit vom Funktionszustand des Organs reguliert werden. So lassen sich in Alveolarzellen, in der Trachea und in den Azini nasaler Drüsen fast nur  $\alpha$ - und  $\gamma$ -ENaC mRNA nachweisen, wohingegen im Epithel der Bronchiolen und in den Ausführungsgängen nasaler Drüsen mRNA von allen drei Untereinheiten gefunden wird [Matsushita et al. (1996); Farman et al. (1997)]. Im distalen Kolon wird in Abwesenheit von Aldosteron hauptsächlich  $\alpha$ -ENaC transkribiert [Lingueglia et al. (1994); Renard et al. (1995); Asher et al. (1996)]. Im Epithel der Harnblase von Ratten wird unter normalen Stoffwechselbedingungen  $\alpha$ - und  $\beta$ -rENaC jeweils fünf- bis zehnmal häufiger transkribiert als  $\gamma$ -rENaC [Smith et al. (1998)]. In der Mausniere wurde schließlich beobachtet, daß  $\alpha$ -ENaC mRNA etwa doppelt so stark angereichert wird wie  $\beta$ - oder auch  $\gamma$ -ENaC mRNA [MacDonald et al. (2000)].

Die letztgenannten Befunde von der Mausniere stimmen relativ gut mit den Beobachtungen an M-1 Zellen aus der Mausniere überein. In Northern Blot Experimenten an M-1 Zellen fanden Letz et al. (1995), daß die  $\alpha$ -Untereinheit von ENaC sehr viel kräftigere Banden ausbildete als die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Das läßt vermuten, daß die Menge der translatierten ENaC-Untereinheit durch die Transkription der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten limitiert wird, und diese Vermutung wird durch die vorliegenden Expressionsstudien unterstützt. So führte die Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC cRNA zu signifikant höheren Amilorid-sensitiven Einwärtsströmen als die alleinige Injektion von M-1 mRNA. Es fragt sich deshalb, ob die ENaC Aktivität in M-1 Zellen über Änderungen der Transkription der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten geregelt wird, und welche Hormone dafür verantwortlich sein könnten.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Transkription der ENaC-Untereinheiten in den meisten Epithelien unter dem Einfluß von Gluko- und Mineralokortikoiden steht. Im Atemwegsepithel wird die Expression von ENaC mRNA offenbar ausschließlich durch Glukokortikoide reguliert, im distalen Kolon hingegen durch Aldosteron. Aldosteron führt dort zu einer gesteigerten Transkription der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC mRNA [Renard et al. (1995); Asher et al. (1996)]. In der Niere scheint die Regulation der Transkription unterschiedlich zu erfolgen, wobei offenbar zwischen dem kortikalen und dem äußeren und inneren medullären Sammelrohr differenziert werden muß und sich die Wirkungen der Gluko- und Mineralokortikoide in verschiedenen Tierspezies unterscheiden. Überdies sind die Befunde verschiedener Untersuchungen nicht immer deckungsgleich. Während in Untersuchungen von Renard et al. (1995) und Stokes & Sigmund (1998) sowohl Aldosteron als auch Dexamethason im Nierenkortex von Ratten keine Veränderung im Transkriptionsverhältnis der verschiedenen ENaC-Untereinheiten bewirkten, erhöhten sie in Experimenten von Asher et al. (1996) am gleichen Gewebe die Expression von  $\alpha$ -rENaC mRNA. In Primärkulturen von Zellen aus dem kortikalen Sammelrohr von Kaninchen beobachteten Dijkink et al. (1999), daß die mRNA aller drei ENaC-Untereinheiten nach Aldosterongabe anstieg. Denault et al. (1996) konnten in einer ähnlichen Zellkultur aber lediglich eine Erhöhung von  $\gamma$ -ENaC mRNA ausmachen. Im Nierenkortex der Maus fanden MacDonald et al. (2000) nach Aldosterongabe einen geringen Anstieg der  $\alpha$ -ENaC mRNA, während Dexamethasongabe keinen Effekt hatte. Im Gegensatz dazu erhöhten in den Experimenten von Sayegh et al. (1999) 100 nM Dexamethason an M-1 Zellen die Transkription von  $\alpha$ -ENaC mRNA. Die Transkription der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC Untereinheiten wurde dort nicht untersucht.

Ähnlich uneinheitlich ist die Wirkung von Dexamethason und Aldosteron auf posttranskriptioneller Ebene. Renard et al. (1995) fanden keinen Effekt von Kortikoiden auf das Sammelrohr der Ratte, während Masilamani et al. (1999) im gleichen Gewebe vom gleichen Tier über einen vermehrten Einbau von ENaC-Kanalproteinen berichten. In der Kaninchenniere führt Aldosteron zu einer gesteigerten Proteinsynthese von  $\alpha$ - und  $\beta$ -ENaC [Dijkink et al. (1999)], und der gleiche Effekt wurde auch in A6 Zellen beobachtet, die auf Filter gewachsen waren [May et al. (1997)].<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Außer durch Mineralo- und Glukokortikoide kann die Transkription und Translation von ENaC-Untereinheiten offenbar auch durch Vasopressin beeinflusst werden. So beobachteten Djelidi et al. (1997), daß hohe Vasopressinkonzentrationen, die allerdings physiologische Spiegel weit überschreiten, die Transkription und die Translation der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC Untereinheit im kortikalen Sammelrohr der Ratte erhöhten.

Da das Kulturmedium (PC-1), in dem die M-1 Zellen gezogen werden, 5  $\mu$ M Dexamethason enthält (s. Kapitel „Material und Methoden“), ist davon auszugehen, daß die Expression von Na<sup>+</sup>-Kanälen in den vorliegenden Experimenten maximal stimuliert war. In dieser Konzentration entfaltet Dexamethason nämlich nicht nur die maximale Glukokortikoidwirkung, sondern auch eine maximale Mineralokortikoidwirkung [Grotjohann et al. (1999)]. Tatsächlich entsprachen die von Letz et al. (1995) in Ganzzellstrommessungen am gleichen Präparat beobachteten Amilorid-sensitiven Einwärtsströme recht gut den Amilorid-sensitiven Einwärtsströmen, die in Ganzzellstromexperimenten an isolierten Sammelrohren der Ratte gemessen wurden, wenn die Tiere zuvor maximal mit Aldosteron stimuliert waren [Palmer et al. (1993)].

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die überproportionale Expression der  $\alpha$ -ENaC mRNA in M-1 Zellen in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen am Nierenkortex von Ratte und Maus [Asher et al. (1996); Sayegh et al. (1999); MacDonald et al. (2000)] vermutlich als Folge einer maximalen Stimulation durch Dexamethason zu verstehen ist.

Weshalb die Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten dann trotzdem zur Ausbildung 24-fach höherer Amilorid-sensitiver Ströme führte als die alleinige Injektion von M-1 mRNA, könnte auf eine unterschiedliche Regulation der Translation in Oozyten und in M-1 Zellen zurückzuführen sein. In M-1 Zellen könnte die hohe Transkription der  $\alpha$ -rENaC Untereinheit möglicherweise durch eine verstärkte Translation der niedrig transkribierten  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC Untereinheiten ausgeglichen werden, während die Translation in Oozyten lediglich durch die vorhandene Menge der mRNA bzw. cRNA bestimmt sein könnte. Dies würde bedeuten, daß die Injektion von M-1 mRNA zum Einbau nur weniger vollständiger ENaC in die Zellmembran führen könnte, während daneben eine große Anzahl von Ionenkanälen exprimiert würde, die lediglich aus der  $\alpha$ -ENaC Untereinheit bestehen und die nur entsprechend kleine Einwärtsströme zulassen. In diesem Fall könnte dann die Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC cRNA, wie in der Tat beobachtet wurde, wesentlich höhere Ströme ergeben, weil sich die überproportional vorhandenen  $\alpha$ -ENaC Untereinheiten mit einer ausreichenden Zahl von  $\beta$ - oder  $\gamma$ -rENaC Untereinheiten verbinden könnten.

*Koexpression von M-1 mRNA mit  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA führt zu Ionenkanälen mit veränderten Eigenschaften gegenüber  $\alpha\beta\gamma$ -ENaC*

Im letzten Absatz wurde festgestellt, daß die Koinjektion von  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA in *Xenopus laevis* Oozyten die in M-1 Zellen überproportional exprimierte  $\alpha$ -ENaC Untereinheit zu vollständigen epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanälen (ENaC) zu komplementieren scheint. Dies zeigte sich in der Ausbildung eines deutlich höheren Einwärtsstromes als nach alleiniger Injektion von M-1 mRNA. Bei der weiteren Untersuchung wiesen diese Kanäle eine etwas andere Kationen-Selektivität auf als die Kanäle von Oozyten, in die  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA injiziert worden war, oder als Kanäle von M-1 Zellen [Letz et al. (1995)]. Die Permeabilitätssequenz  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ >> \text{K}^+$  war zwar erhalten, aber das Verhältnis von  $\text{Li}^+$  zu  $\text{Na}^+$  betrug 2,84 und war damit signifikant höher als in den genannten Experimenten, in denen ein Leitfähigkeitsverhältnis von  $\text{Li}^+$  zu  $\text{Na}^+$  von ca. 1,6 beobachtet worden war. Dies ist überraschend, wenn man davon ausgeht, daß voll funktionierende Kanäle stets aus der gleichen Anzahl und Art von Untereinheiten aufgebaut sein sollten.

Nach Experimenten von Kellenberger et al. (1999) wird die Selektivität von ENaC wesentlich durch die Größe der Porenöffnung bestimmt. Punktmutationen kurz vor dem zweiten transmembranären Abschnitt einer der drei ENaC-Untereinheiten führen zur Veränderung der Kanalgeometrie und zur Abnahme der Selektivität. Dies erklärt, weshalb ENaC sehr gut durchlässig ist für Wasserstoffionen ( $\text{H}^+$ ), weniger durchlässig für  $\text{Li}^+$ , noch weniger für  $\text{Na}^+$  aber undurchlässig für alle größeren Kationen [Palmer (1982)].

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Erhöhung der Selektivität von ENaC für  $\text{Li}^+$  bei Koexpression von M-1 mRNA mit  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten könnte folglich auf einer Veränderung der Kanalgeometrie beruhen. Eine solche Veränderung könnte verschiedene Ursachen haben:

1) *Heterolog zusammengesetzte Kanäle*: Da die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC Untereinheiten von der Ratte stammen, die M-1 Zelllinie aber von der Maus, könnten Speziesunterschiede in der Geometrie der einzelnen Kanaluntereinheit unterschiedliche Selektivitäten eines Hybrid-Kanals z.B. aus der  $\alpha$ -ENaC Untereinheit der Maus und den  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC Untereinheiten der Ratte hervorrufen. Speziesunterschiede von ENaC sind in der Tat bekannt. So zeigt z.B. die  $\alpha$ -ENaC Untereinheit der Ratte im Aminosäurenvergleich nur eine 83 %ige



Identität mit der  $\alpha$ -ENaC Untereinheit des Menschen. Ob ähnliche Unterschiede zwischen Ratte und Maus bestehen, ist nicht bekannt. Andererseits ist jedoch anzunehmen, daß die Proteinabschnitte, die für die Selektivität verantwortlich sind, auch zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert sind, so daß dieser Erklärungsansatz eher unwahrscheinlich ist. In diesem Zusammenhang wäre es interessant gewesen, die Selektivität von Kanälen nach Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\alpha$ -,  $\alpha\beta$ - oder  $\alpha\gamma$ -ENaC cRNA zu untersuchen. Wegen der niedrigen Ströme war dies im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich.

2) *Unterschiedliche Zusammensetzung des Kanals aus Untereinheiten:* In den vorliegenden Experimenten wurden jeweils 20 ng M-1 mRNA und je 1 ng cRNA der einzelnen ENaC Untereinheiten in die Oozyten injiziert. Da es sich bei der M-1 mRNA um die gesamte mRNA von M-1 Zellen handelt, kann man davon ausgehen, daß in diesen 20 ng der Anteil, der für  $\alpha$ -ENaC kodiert, wesentlich weniger als 1 ng beträgt. Somit sollte nach Koinjektion von M-1 mRNA und  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -rENaC cRNA überwiegen. Unter diesen Bedingungen könnte sich das stöchiometrische Verhältnis der gebildeten ENaC von dem Verhältnis nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA unterscheiden, was wiederum zu veränderten Kanaleigenschaften führen könnte.

Aus Untersuchungen von McNicholas & Canessa (1997) ist bekannt, daß  $\text{Na}^+$ -Kanäle, die nur aus einer oder zwei ENaC-Untereinheiten zusammengesetzt sind, andere Eigenschaften haben können als  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC. Während  $\alpha$ - und  $\alpha\gamma$ -ENaC sich nicht wesentlich von  $\alpha\beta\gamma$ -ENaC unterscheiden, hat  $\alpha\beta$ -ENaC deutlich veränderte Eigenschaften: Seine Sensitivität gegenüber Amilorid und dessen Analogon Benzamil beträgt nur ungefähr ein Dreißigstel derjenigen von  $\alpha\beta\gamma$ -ENaC, und seine Selektivität für  $\text{Na}^+$  und  $\text{Li}^+$  ist umgekehrt, mit einer leichten Präferenz für  $\text{Na}^+$  über  $\text{Li}^+$  (das Verhältnis des Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms in  $\text{Li}^+$  zu  $\text{Na}^+$  beträgt 0,8) bei weiterhin fehlender  $\text{K}^+$ -Permeabilität [McNicholas & Canessa (1997)]. Überdies wird die Einzelkanalleitfähigkeit der  $\alpha\beta$ -rENaC erst bei viel höheren  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{Li}^+$ -Konzentrationen gesättigt ( $\text{EC}_{50} > 180 \text{ mM}$ ) als die Leitfähigkeit von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC, die bereits bei Konzentrationen von 50 bzw. 30 mM halbgesättigt ist. Zudem weisen sowohl  $\alpha\gamma$ - als auch  $\alpha\beta$ -Kanäle gegenüber  $\alpha\beta\gamma$ -ENaC eine veränderte Schaltkinetik mit z.T. komplexem Öffnungs- und Schließverhalten auf [Fyfe & Canessa (1998)].

Zu den vorangehenden Betrachtungen ist allerdings anzumerken, daß bis heute die Stöchiometrie der Untereinheitenstruktur von  $\alpha\beta\gamma$ -ENaC noch nicht endgültig geklärt ist, obwohl verschiedene funktionelle, biochemische und biophysikalische Versuchsansätze dazu entwickelt wurden. Experimente, in denen ENaC Untereinheiten mit dem FLAG Epitop markiert wurden, Versuche zur Hemmung von ENaC mit mutierter  $\alpha$ -Untereinheit durch Zink und Versuche mit aneinandergelinkten ENaC-Untereinheiten ergaben, daß  $\alpha\beta\gamma$ -ENaC in *Xenopus laevis* Oozyten in einer Stöchiometrie von 2 $\alpha$ -, 1 $\beta$ - und 1 $\gamma$ -ENaC zusammengesetzt ist [Firsov et al. (1998)]. Eine weitere Studie, in der ebenfalls die veränderte Sensitivität für Hemmstoffe von mutierten ENaC Untereinheiten ausgenutzt wurde, kam zu demselben Schluß [Kosari et al. (1998)]. Dieser Untereinheiten-Stöchiometrie widersprechen die Ergebnisse zweier weiterer Studien, in denen u.a. auch die Sedimentationseigenschaften der Kanäle in Saccharose-Dichtegradienten gemessen wurden [Snyder et al. (1998)] und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt wurden, und die eine Stöchiometrie von 3 $\alpha$ -, 3 $\beta$ - und 3 $\gamma$ -ENaC Untereinheiten favorisieren [Eskandari et al. (1999)].

Möglicherweise ist aber die Stöchiometrie der Untereinheitenzusammensetzung nicht fest vorgegeben, sondern richtet sich nach der Verfügbarkeit der einzelnen Untereinheiten. Aufgrund des Überangebots an  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC Untereinheiten in den hier durchgeführten Koexpressionsexperimenten nach Injektion von M-1 mRNA und  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA könnten die Kanäle z.B. aus 1 $\alpha$ -, 2 $\beta$ - und 1 $\gamma$ - oder 1 $\alpha$ -, 1 $\beta$ - und 2 $\gamma$ -Untereinheiten zusammengesetzt sein und damit ähnlich wie  $\alpha\beta$ -ENaC andere Selektivitätseigenschaften als die bisher untersuchten ENaC-Kombinationen angenommen haben. Um dieser Frage nachzugehen, wäre es sinnvoll gewesen, Koexpressionsexperimente mit M-1 mRNA und markierter  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA durchzuführen, um aus der Anzahl der in die Oozytenmembran eingebauten markierten Untereinheiten auf die Stöchiometrie der Untereinheiten schließen zu können. Solche Untersuchungen waren aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

3) *Eine bisher unbekannte zusätzliche Untereinheit*: Eine weitere Möglichkeit die hohe Selektivität für  $\text{Li}^+$  über  $\text{Na}^+$  zu erklären, die nach Injektion von M-1 mRNA mit  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA exprimiert wurde, wäre, daß M-1 mRNA für eine weitere ENaC Untereinheit kodiert, die zwar normalerweise in M-1 Zellen nicht translatiert wird, wohl aber nach Injek-

tion der mRNA in *Xenopus laevis* Oozyten. Eine weitere ENaC Untereinheit, die in Aldosteron-sensitiven Epithelien nicht exprimiert wird, wurde in der Tat kürzlich im menschlichen Gehirn entdeckt und  $\delta$ -ENaC genannt [Waldmann et al. (1995)]. Sie findet sich außerdem im Pankreas, in den Testes und den Ovarien. Ähnlich der  $\alpha$ -ENaC Untereinheit ist sie in der Lage, ohne andere Untereinheiten einen funktionierenden Kanal zu bilden, der sich jedoch in seinen Eigenschaften von  $\alpha$ -ENaC unterscheidet. Er ist wesentlich weniger sensitiv für Amilorid oder Benzamil, ebenfalls hochselektiv für  $\text{Na}^+$  gegenüber  $\text{K}^+$  und hat eine leichte Präferenz für  $\text{Na}^+$  über  $\text{Li}^+$  (das Verhältnis des Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms in  $\text{Li}^+$  zu  $\text{Na}^+$  beträgt 0,6). Der Sequenzvergleich von  $\delta$ -ENaC mit  $\alpha\beta\gamma$ -ENaC zeigt, daß  $\delta$ -ENaC eine große Ähnlichkeit mit  $\alpha$ -ENaC hat. Koexpressionsexperimente mit unterschiedlichen Kombinationen der vier Untereinheiten führten zu der Annahme, daß im nativen Gewebe wahrscheinlich die Kombination  $\delta\beta\gamma$ -ENaC exprimiert wird [Waldmann et al. (1995)].

Es kann also sein, daß die hier beobachtete Erhöhung der Selektivität für  $\text{Li}^+$  gegenüber  $\text{Na}^+$  durch Expression einer neuen, bisher unbekanntenen ENaC Untereinheit bewirkt wird, die zu einem Ionenkanal mit ebenfalls neuen Eigenschaften führt.

*Kodiert M-1 mRNA für ein Protein, das  $\alpha\beta\gamma$ -ENaC regulieren kann?*

Koinjektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA bewirkte überraschenderweise eine Erhöhung des Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms auf mehr als das Doppelte des nach alleiniger Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA beobachteten Amilorid-sensitiven Einwärtsstromes. Diese Beobachtung läßt sich nicht durch einfache Addition der durch  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA und M-1 mRNA induzierten Ströme erklären, da der Amilorid-sensitive Einwärtsstrom nach alleiniger Injektion von M-1 mRNA nur 0,5 % des Stroms nach Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA betrug. Die Verdoppelung des Stroms nach Koinjektion läßt deshalb vermuten, daß M-1 Zellen ein Protein exprimieren, das den Strom durch ENaC aktivieren kann.

Für die mögliche Existenz solcher Regulatorproteine gibt es in der Literatur bereits einige Hinweise. So wurde sowohl an A6- als auch an mpkCCD<sub>c14</sub> Zellen, einer anderen Zellreihe aus dem kortikalen Sammelrohr der Maus, eine epitheliale Serinprotease (CAP1 für „channel activating protease 1“) gefunden, die auch in der Niere, der Lunge, der Haut,

dem Ovar und im Darm exprimiert wird und Amilorid-sensitive Einwärtsströme von der extrazellulären Seite der Zellmembran aktiviert [Vallet et al. (1997)]. Unter der Einwirkung von CAP1 nimmt der Amilorid-sensitive Einwärtsstrom um das Zwei- bis Dreifache zu [Vuagniaux et al. (2000)]. Auch an M-1 Zellen wurden Beobachtungen gemacht, die auf die Existenz einer endogenen ENaC-aktivierenden Protease hinweisen [Nakhoul et al. (1998)]. Der Wirkmechanismus dieser Proteasen ist noch nicht aufgeklärt. Die Annahme, daß CAP1 ihre Wirkung über den durch Serinproteasen aktivierbaren Rezeptor PAR-2 entfaltet, wurde kürzlich widerlegt [Bertog et al. (1999)]. Möglicherweise wirkt CAP1 durch Proteolyse eines mit ENaC assoziierten Modulatorproteins [Chraïbi et al. (1998)].

Da davon auszugehen ist, daß die in dieser Arbeit verwendeten M-1 Zellen durch das Dexamethason im Kulturmedium aktiviert waren, könnten durch die M-1 mRNA auch die beiden bisher bekannten Kortikoid-induzierten Proteine K-Ras2A und sgk exprimiert worden sein, die am Entstehen des frühen aktivierenden Effekts von Aldosteron auf ENaC beteiligt sein sollen.

K-Ras2A ist ein G-Protein, das in A6 Zellen durch Aldosteron induziert wird und dessen Expression in *Xenopus laevis* Oozyten die Reifung der Oozyten hervorruft. Koexpressionsexperimente von  $\alpha\beta\gamma$ -xENaC mit K-Ras2A in Oozyten zeigten zwei entgegengesetzte Effekte [Mastroberardino et al. (1998)]: Durch die Reifung der Oozyte wurde die Kanaldichte in der Zellmembran verringert, durch eine direkte Wirkung von K-Ras2A auf ENaC wurde sie erhöht. Die Summation der Effekte führte zu keiner signifikanten Veränderung der Amilorid-sensitiven Ströme im Vergleich zu den Strömen nach alleiniger Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -xENaC cRNA. Um die Wirkung von K-Ras2A auf ENaC von den Effekten der durch K-Ras2A induzierten Reifung der Oozyten abgrenzen zu können, führten Mastroberardino et al. (1998) Kontrollexperimente durch, in denen  $\alpha\beta\gamma$ -xENaC cRNA injizierte Oozyten in 15  $\mu$ M Progesteron inkubiert wurden, welches ähnlich wie K-Ras2A, allerdings auf anderem Wege, eine Reifung der Oozyten bewirkt. Im Vergleich zu diesen Kontrolloozyten zeigten die koinjizierten Oozyten vier- bis fünffach größere Amilorid-sensitive Einwärtsströme [Mastroberardino et al. (1998)]. Da die vorliegenden Experimente ebenfalls an Oozyten durchgeführt wurden, hätte eine Koexpression von K-Ras2A aus M-1 mRNA mit  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA wie bei Mastroberardino et al. (1998) zu keiner signifikanten Veränderung der Amilorid-sensitiven Einwärtsströme führen sollen. Deshalb ist

es eher unwahrscheinlich, daß K-Ras2A als Bestandteil der M-1 mRNA die Verdoppelung der Ströme nach Koinjektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA bewirkt haben könnte.

Das zweite Aldosteron-induzierte Protein ist die Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase (sgk). Ihre Transkription ist bereits 30 min nach Aldosterongabe erhöht. Koexpression von sgk mit  $\alpha\beta\gamma$ -ENaC in *Xenopus laevis* Oozyten führt je nach Versuchsprotokoll zu einem Anstieg des Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms auf das Zwei- bis Siebenfache gegenüber dem Strom in Oozyten, die lediglich  $\alpha\beta\gamma$ -ENaC exprimieren [Chen et al. (1999); Náray-Fejes-Tóth et al. (1999); Shigaev et al. (2000)], wobei diese aktivierende Wirkung hauptsächlich auf dem verstärkten Einbau von ENaC in die Zellmembran beruht [de La Rosa et al. (1999)].

Eine gesteigerte Expression von sgk aus M-1 mRNA könnte folglich die bisher diskutierten Koexpressionseffekte von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA und M-1 mRNA in den vorliegenden Versuchen erklären. Hinzu kommen weitere Beobachtungen aus Koexpressionsexperimenten. Während Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\alpha$ -rENaC cRNA keine Veränderung des Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms bewirkte, sank nach Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\alpha\beta$ - oder auch  $\alpha\gamma$ -rENaC cRNA der Amilorid-hemmbarer Einwärtsstrom im Vergleich zu alleiniger Injektion von  $\alpha\beta$ - oder  $\alpha\gamma$ -rENaC cRNA deutlich ab. Der letztere Effekt deckt sich in etwa mit Befunden von Ott (1999), wonach Koinjektion von  $\alpha$ -rENaC cRNA mit sgk vom Menschen zu einer deutlichen Aktivierung des Amilorid-sensitiven Einwärtsstromes führte (wie in den vorliegenden Experimenten mit  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA und M-1 mRNA), Koinjektion von  $\alpha\beta$ -,  $\alpha\gamma$ - oder  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA mit sgk aber keinen stimulierenden Effekt hatte.

Wie die fehlende oder hemmende Wirkung von sgk oder M-1 mRNA auf die Zweierkombinationen von rENaC cRNA zu erklären ist, bleibt offen. Es sei aber angemerkt, daß der in den vorliegenden Experimenten beobachtete 24-fache Anstieg der Amilorid-sensitiven Ströme nach Koinjektion von M-1 mRNA mit der Zweierkombination von  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC cRNA vor dem Hintergrund der obigen Experimente mit Zweierkombinationen um so eindrucksvoller ist.

Insgesamt gesehen weisen die im letzten Kapitel diskutierten Befunde stark daraufhin, daß die Expression von ENaC aus verschiedenen Kombinationen von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -rENaC cRNA mit M-1 mRNA durch die Koexpression regulierender Proteine aus M-1 mRNA beeinflußt wird, wobei vielleicht CAP1 und wahrscheinlich sgk eine Rolle spielen, aber das Vorhandensein weiterer regulatorischer Proteine nicht ausgeschlossen werden kann. Die Aufklärung dieser regulierenden Proteine, für die diese Arbeit erste Hinweise gibt, könnte bedeutende Einblicke in die Regulation des epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanals in der Niere liefern. Langfristig wäre dies möglicherweise ein weiterer Schritt in der Aufklärung von Ursachen des essentiellen Bluthochdrucks.

---

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene durch Amilorid hemmbare Kationenkanäle in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht.

Der erste Teil befaßt sich mit einem endogenen nichtselektiven Kationenkanal, der durch das aus dem marinen Einzeller *Gambierdiscus toxicus* stammende Maitotoxin (MTX) aktiviert wird. Messungen des Membranpotentials ( $V_m$ ) zeigten, daß MTX (50 pM bis 1nM) die Oozyten von  $-49 \pm 7$  mV auf  $-14 \pm 1$  mV depolarisierte. Der Austausch von  $\text{Na}^+$  in der Badlösung durch das nicht permeierende Kation NMDG veränderte  $V_m$  von  $-14 \pm 1$  mV auf  $-53 \pm 5$  mV ( $n=29$ ). Dies weist auf die Aktivierung einer Kationenleitfähigkeit durch MTX hin. Strommessungen bei einem Haltepotential von  $-60$  oder  $-100$  mV zeigten, daß sich innerhalb von 10 s nach Applikation von MTX eine Einwärtsstromkomponente ausbildete, die durch Entzug von extrazellulärem  $\text{Na}^+$  größtenteils gehemmt wurde. Nach 1-minütiger Applikation von 1 nM MTX stieg der NMDG-sensitive Strom um mehr als das Hundertfache von  $0,14 \pm 0,03$  mA bis auf einen Maximalwert von  $21 \pm 3$  mA ( $n=11$ ) an. Der Effekt von MTX war konzentrationsabhängig mit einer  $EC_{50}$  von ca. 250 pM, jedoch nur langsam (60 min) reversibel. Experimente mit Austausch von Ionen in der Badlösung zeigten, daß die stimulierte Leitfähigkeit nichtselektiv für einwertige Kationen mit einer leichten Bevorzugung für  $\text{NH}_4^+$  (2,1) >  $\text{K}^+$  (1,5) >  $\text{Na}^+$  (1,0) >  $\text{Li}^+$  (0,7) war. Bei der Betrachtung zweiwertiger Kationen wurde eine komplexe biphasische Antwort auf den extrazellulären Ersatz von  $\text{Na}^+$  durch  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet. Dies läßt vermuten, daß die stimulierten Ionenkanäle eine geringe  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität haben, die zu einem initialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führen, daß die Kanäle aber unter längerer Einwirkung hoher extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen allmählich blockiert werden. Keine signifikante Leitfähigkeit wurde für  $\text{Mn}^{2+}$  beobachtet. Applikation von 1 mM Benzamil, 1 mM Amilorid oder 100 mM SK&F 96365 reduzierte den MTX-stimulierten Einwärtsstrom um 81 %, 62 % bzw. 65 %.  $\text{Gd}^{3+}$  hatte bei Konzentrationen von 10 mM bzw. 100 mM einen hemmenden Effekt von 29 % bzw. 38 %. Flufenaminsäure, Nifluminsäure, LOE 908 und DCDPC, bekannte Blocker anderer nichtselektiver Kationenkanäle, hatten keinen signifikanten Effekt.

Daraus kann geschlossen werden, daß MTX eine nichtselektive Kationenleitfähigkeit in *Xenopus laevis* Oozyten aktiviert. Die zugrundeliegenden Ionenkanäle könnten an

Änderungen des Membranpotentials, die in frühen Stadien der Befruchtung auftreten, beteiligt sein.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschreibt das Expressionsverhalten und die Eigenschaften einer aus mRNA einer Sammelrohrzelllinie der Maus (M-1) und aus cRNA verschiedener Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals rENaC in Oozyten exprimierten hoch Amilorid-sensitiven Natriumleitfähigkeit.

Zunächst wurde gezeigt, daß Injektion der RNA aller drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , kurz als  $\alpha\beta\gamma$  bezeichnet) von rENaC cRNA aus Rattenkolon in *Xenopus laevis* Oozyten zur Ausbildung Amilorid-sensitiver Einwärtsströme mit denselben Eigenschaften führte, wie sie in der Literatur beschrieben wurden. Injektion von M-1 mRNA in *Xenopus laevis* Oozyten führte in einer Versuchsreihe zur Koexpression von M-1 mRNA mit  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA dagegen nur zur Ausbildung eines kleinen Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms von  $4,3 \pm 0,88$  nA ( $n=49$ ), dessen Eigenschaften nicht näher untersucht werden konnten. Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA erhöhte den Amilorid-sensitiven Einwärtsstrom auf das 24-fache ( $97 \pm 12,8$  nA;  $n=55$ ). Der unter diesen Bedingungen exprimierte Ionenkanal zeigte eine höhere Selektivität für  $\text{Li}^+$  über  $\text{Na}^+$  ( $\text{Li}^+/\text{Na}^+=2,84$ ) als  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC ( $\text{Li}^+/\text{Na}^+=1,59$ ), war aber ebenso sensitiv für Amilorid wie der ursprüngliche  $\text{Na}^+$ -Kanal ( $\text{IC}_{50}=5,1 \cdot 10^{-8}$  M). Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\alpha\beta$ - oder  $\alpha\gamma$ -rENaC cRNA führte zu einem Amilorid-sensitiven Einwärtsstrom ( $9,7 \pm 1,8$  nA;  $n=31$ , bzw.  $50 \pm 5,9$  nA;  $n=32$ ), der nur etwa 20 % bzw. 50 % des beobachteten Stroms nach alleiniger Injektion von  $\alpha\beta$ - bzw.  $\alpha\gamma$ -rENaC cRNA ( $46 \pm 11$  nA;  $n=31$ , bzw.  $107 \pm 19$  nA;  $n=32$ ) betrug.

Koinjektion von M-1 mRNA mit  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA führte dagegen mit  $1470 \pm 167$  nA ( $n=154$ ) zu einem deutlichen Anstieg des Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms gegenüber dem Strom nach alleiniger Injektion von  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC ( $980 \pm 100$  nA;  $n=148$ ).

Diese Befunde zeigen, daß im *Xenopus laevis* Oozyten Expressionssystem die Translation der M-1 mRNA offenbar anders reguliert wird als in M-1 Zellen, wobei das Vorhandensein von  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC mRNA der limitierende Bestandteil für die Bildung von ENaC zu sein scheint. Die leicht veränderten Eigenschaften der Ionenkanäle nach Koexpression von M-1 mRNA mit  $\beta\gamma$ -rENaC cRNA könnten durch die Kombination von mRNA ver-



schiedener Spezies, durch eine veränderte Stöchiometrie der Kanaluntereinheiten (in Abhängigkeit von der injizierten Menge der mRNA der einzelnen Untereinheiten) oder durch die mögliche Expression einer neuen, bisher unbekanntes ENaC Untereinheit in der M-1 mRNA verursacht worden sein. Die Erhöhung des Amilorid-sensitiven Einwärtsstroms durch Koexpression von M-1 mRNA mit  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC cRNA läßt darauf schließen, daß M-1 Zellen ein Protein exprimieren, das die Expression des epithelialen Natriumkanals stimuliert.

---

## Literatur

- Abriel, H., Loffing, J., Rebhun, J. F., Pratt, J. H., Schild, L., Horisberger, J. D., Rotin, D. und Staub, O. (1999). Defective regulation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *Journal of Clinical Investigation* **103** (5): 667-673.
- Ackerman, M. J., Wickman, K. D. und Clapham, D. E. (1994). Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *Journal of General Physiology* **103** (2): 153-179.
- Arellano, R. O., Woodward, R. M. und Miledi, R. (1995). A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology - London* **484** (Pt 3): 593-604.
- Asher, C., Wald, H., Rossier, B. C. und Garty, H. (1996). Aldosterone-induced increase in the abundance of Na<sup>+</sup> channel subunits. *American Journal of Physiology* **271** (2 Pt 1): C605-C611.
- Barish, M. E. (1983). A transient calcium-dependent chloride current in the immature *Xenopus* oocyte. *Journal of Physiology - London* **342** : 309-325.
- Bement, W. M. und Capco, D. G. (1990). Protein kinase C acts downstream of calcium at entry into the first mitotic interphase of *Xenopus laevis*. *Cell Regulation* **1** (3): 315-326.
- Ben Efraim, I., Shai, Y. und Attali, B. (1996). Cytoplasmic and extracellular IsK peptides activate endogenous K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in *Xenopus* oocytes. Evidence for regulatory function. *Journal of Biological Chemistry* **271** (15): 8768-8771.
- Bernard, V., Laurent, A., Derancourt, J., Clement Durand, M., Picard, A., Le Peuch, C., Berta, P. und Doree, M. (1988). Maitotoxin triggers the cortical reaction and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate breakdown in amphibian oocytes. *European Journal of Biochemistry* **174** (4): 655-662.
- Bertog, M., Letz, B., Kong, W., Steinhoff, M., Higgins, M. A., Bielfeld Ackermann, A., Frömter, E., Bunnett, N. W. und Korbmayer, C. (1999). Basolateral proteinase-activated receptor (PAR-2) induces chloride secretion in M-1 mouse renal cortical collecting duct cells. *Journal of Physiology - London* **521** (1): 3-17.

- Bossi, E., Centinaio, E., Moriondo, A. und Peres, A. (1998).  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence of the depolarization-inducible  $\text{Na}^+$  current of *Xenopus* oocytes. *Journal of Cellular Physiology* **174** (2): 154-159.
- Burckhardt, B. C. und Burckhardt, G. (1997).  $\text{NH}_4^+$  conductance in *Xenopus laevis* oocytes. I. Basic observations. *Pflügers Archiv* **434** (3): 306-312.
- Burckhardt, B. C. und Frömter, E. (1992). Pathways of  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflügers Archiv* **420** (1): 83-86.
- Burckhardt, B. C., Kroll, B. und Frömter, E. (1992). Proton transport mechanism in the cell membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Archiv* **420** (1): 78-82.
- Burckhardt, B. C. und Thelen, P. (1995). Effect of primary, secondary and tertiary amines on membrane potential and intracellular pH in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Archiv* **429** (3): 306-312.
- Canessa, C. M., Horisberger, J. D. und Rossier, B. C. (1993). Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* **361** (6411): 467-470.
- Canessa, C. M., Horisberger, J. D., Schild, L. und Rossier, B. C. (1995). Expression cloning of the epithelial sodium channel. *Kidney International* **48** (4): 950-955.
- Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D. und Rossier, B. C. (1994). Amiloride-sensitive epithelial  $\text{Na}^+$  channel is made of three homologous subunits. *Nature* **367** (6462): 463-467.
- Chen, S. Y., Bhargava, A., Mastroberardino, L., Meijer, O. C., Wang, J., Buse, P., Firestone, G. L., Verrey, F. und Pearce, D. (1999). Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** (5): 2514-2519.
- Choi, O. H., Padgett, W. L., Nishizawa, Y., Gusovsky, F., Yasumoto, T. und Daly, J. W. (1990). Maitotoxin: effects on calcium channels, phosphoinositide breakdown, and arachidonate release in pheochromocytoma PC12 cells. *Molecular Pharmacology* **37** (2): 222-230.

- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162** : 156-159.
- Chraïbi, A., Vallet, V., Firsov, D., Hess, S. K. und Horisberger, J. D. (1998). Protease modulation of the activity of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of General Physiology* **111** (1): 127-138.
- Costa, P. F., Emilio, M. G., Fernandes, P. L., Ferreira, H. G. und Ferreira, K. G. (1989). Determination of ionic permeability coefficients of the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes under voltage clamp. *Journal of Physiology - London* **413** : 199-211.
- Cougnon, M., Bouyer, P., Hulin, P., Anagnostopoulos, T. und Planelles, G. (1996). Further investigation of ionic diffusive properties and of  $\text{NH}_4^+$  pathways in *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflügers Archiv* **431** (4): 658-667.
- Daly, J. W., Lueders, J., Padgett, W. L., Shin, Y. und Gusovsky, F. (1995). Maitotoxin-elicited calcium influx in cultured cells. Effect of calcium-channel blockers. *Biochemical Pharmacology* **50** (8): 1187-1197.
- Dascal, N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **22** (4): 317-387.
- Dascal, N., Snutch, T. P., Lubbert, H., Davidson, N. und Lester, H. A. (1986). Expression and modulation of voltage-gated calcium channels after RNA injection in *Xenopus* oocytes. *Science* **231** (4742): 1147-1150.
- De La Rosa, D. A., Zhang, P., Náray-Fejes-Tóth, A., Fejes-Tóth, G. und Canessa, C. M. (1999). The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry* **274** (53): 37834-37839.
- Denault, D. L., Fejes-Tóth, G. und Náray-Fejes-Tóth, A. (1996). Aldosterone regulation of sodium channel  $\gamma$ -subunit mRNA in cortical collecting duct cells. *American Journal of Physiology* **271** (1 Pt 1): C423-C428.

- Dietl, P. und Völkl, H. (1994). Maitotoxin activates a nonselective cation channel and stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  entry in MDCK renal epithelial cells. *Molecular Pharmacology* **45** (2): 300-305.
- Dijkink, L., Hartog, A., Deen, P. M., van Os, C. H. und Bindels, R. J. (1999). Time-dependent regulation by aldosterone of the amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  channel in rabbit kidney. *Pflügers Archiv* **438** (3): 354-360.
- Djelidi, S., Fay, M., Cluzeaud, F., Escoubet, B., Eugene, E., Capurro, C., Bonvalet, J. P., Farman, N. und Blot Chabaud, M. (1997). Transcriptional regulation of sodium transport by vasopressin in renal cells. *Journal of Biological Chemistry* **272** (52): 32919-32924.
- Durieux, M. E., Salafranca, M. N. und Lynch, K. R. (1994). Trypsin induces  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  currents in *X. laevis* oocytes. *FEBS Letters* **337** (3): 235-238.
- Ebihara, L. (1996). Xenopus connexin38 forms hemi-gap-junctional channels in the nonjunctional plasma membrane of Xenopus oocytes. *Biophysical Journal* **71** (2): 742-748.
- Eskandari, S., Snyder, P. M., Kreman, M., Zampighi, G. A., Welsh, M. J. und Wright, E. M. (1999). Number of subunits comprising the epithelial sodium channel. *Journal of Biological Chemistry* **274** (38): 27281-27286.
- Estacion, M., Nguyen, H. B. und Gargus, J. J. (1996). Calcium is permeable through a maitotoxin-activated nonselective cation channel in mouse L cells. *American Journal of Physiology* **270** (4 Pt 1): C1145-C1152.
- Farman, N., Talbot, C. R., Boucher, R., Fay, M., Canessa, C., Rossier, B. und Bonvalet, J. P. (1997). Noncoordinated expression of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -subunit mRNAs of epithelial  $\text{Na}^+$  channel along rat respiratory tract. *American Journal of Physiology* **272** (1 Pt 1): C131-C141.
- Firsov, D., Gautschi, I., Merillat, A. M., Rossier, B. C. und Schild, L. (1998). The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO Journal* **17** (2): 344-352.
- Firsov, D., Schild, L., Gautschi, I., Merillat, A. M., Schneeberger, E. und Rossier, B. C. (1996). Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syn-

- drome: a quantitative approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** (26): 15370-15375.
- Fyfe, G. K. und Canessa, C. M. (1998). Subunit composition determines the single channel kinetics of the epithelial sodium channel. *Journal of General Physiology* **112** (4): 423-432.
- Garty, H. und Palmer, L. G. (1997). Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiological Reviews* **77** (2): 359-396.
- Girard, S. und Clapham, D. (1993). Acceleration of intracellular calcium waves in *Xenopus* oocytes by calcium influx. *Science* **260** (5105): 229-232.
- Gögelein, H., Dahlem, D., Englert, H. C. und Lang, H. J. (1990). Flufenamic acid, mefenamic acid and niflumic acid inhibit single nonselective cation channels in the rat exocrine pancreas. *FEBS Letters* **268** (1): 79-82.
- Grey, R. D., Bastiani, M. J., Webb, D. J. und Schertel, E. R. (1982). An electrical block is required to prevent polyspermy in eggs fertilized by natural mating of *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* **89** (2): 475-484.
- Grotjohann, I., Schulzke, J. D. und Fromm, M. (1999). Electrogenic Na<sup>+</sup> transport in rat late distal colon by natural and synthetic glucocorticosteroids. *American Journal of Physiology* **276** (2 Pt 1): G491-G498.
- Gründer, S., Jaeger, N. F., Gautschi, I., Schild, L. und Rossier, B. C. (1999). Identification of a highly conserved sequence at the N-terminus of the epithelial Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$  subunit involved in gating. *Pflügers Archiv* **438** (5): 709-715.
- Gusovsky, F., Bitran, J. A., Yasumoto, T. und Daly, J. W. (1990). Mechanism of maitotoxin-stimulated phosphoinositide breakdown in HL-60 cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **252** (2): 466-473.
- Gusovsky, F., Lueders, J. E., Kohn, E. C. und Felder, C. C. (1993). Muscarinic receptor-mediated tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ . An alternative mechanism for cholinergic-induced phosphoinositide breakdown. *Journal of Biological Chemistry* **268** (11): 7768-7772.

- Hansson, J. H., Nelson Williams, C., et al. (1995). Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel  $\gamma$  subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nature Genetics* **11** (1): 76-82.
- Harvey, K. F., Dinudom, A., Komwatana, P., Jolliffe, C. N., Day, M. L., Parasivam, G., Cook, D. I. und Kumar, S. (1999). All three WW domains of murine Nedd4 are involved in the regulation of epithelial sodium channels by intracellular  $\text{Na}^+$ . *Journal of Biological Chemistry* **274** (18): 12525-12530.
- Huang, H., St Jean, H., Coady, M. J. und Lapointe, J. Y. (1995). Evidence for coupling between  $\text{Na}^+$  pump activity and TEA-sensitive  $\text{K}^+$  currents in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Membrane Biology* **143** (1): 29-35.
- Kado, R. T., Marcher, K. und Ozon, R. (1979). [Demonstration of a long depolarization in the oocytes of *Xenopus laevis*] ORIGINAL TITLE: Mise en evidence d'une depolarisation de longue duree dans l'ovocyte de *Xenopus laevis*. *C-R-Seances-Acad-Sci-D* **288** (15): 1187-1189.
- Katayama, Y. und Widdicombe, J. H. (1991). Halide transport in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology - London* **443** : 587-599.
- Kellenberger, S., Hoffmann Pochon, N., Gautschi, I., Schneeberger, E. und Schild, L. (1999). On the molecular basis of ion permeation in the epithelial  $\text{Na}^+$  channel. *Journal of General Physiology* **114** (1): 13-30.
- Kline, D. (1988). Calcium-dependent events at fertilization of the frog egg: injection of a calcium buffer blocks ion channel opening, exocytosis, and formation of pronuclei. *Developmental Biology* **126** (2): 346-361.
- Kline, D. und Nuccitelli, R. (1985). The wave of activation current in the *Xenopus* egg. *Developmental Biology* **111** (2): 471-487.
- Korbmacher, C., Segal, A. S., Fejes-Tóth, G., Giebisch, G. und Boulpaep, E. L. (1993). Whole-cell currents in single and confluent M-1 mouse cortical collecting duct cells. *Journal of General Physiology* **102** (4): 761-793.

- Kosari, F., Sheng, S., Li, J., Mak, D. O., Foskett, J. K. und Kleyman, T. R. (1998). Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. *Journal of Biological Chemistry* **273** (22): 13469-13474.
- Kowdley, G. C., Ackerman, S. J., John, J. E., 3rd, Jones, L. R. und Moorman, J. R. (1994). Hyperpolarization-activated chloride currents in *Xenopus* oocytes. *Journal of General Physiology* **103** (2): 217-230.
- Krautwurst, D., Hescheler, J., Arndts, D., Losel, W., Hammer, R. und Schultz, G. (1993). Novel potent inhibitor of receptor-activated nonselective cation currents in HL-60 cells. *Molecular Pharmacology* **43** (5): 655-659.
- Krautwurst, D., Seifert, R., Hescheler, J. und Schultz, G. (1992). Formyl peptides and ATP stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  inward currents through non-selective cation channels via G-proteins in dibutyryl cyclic AMP-differentiated HL-60 cells. Involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  in the activation of  $\beta$ -glucuronidase release and superoxide production. *Biochemical Journal* **288** (Pt 3): 1025-1035.
- Kupitz, Y. und Atlas, D. (1993). A putative ATP-activated  $\text{Na}^{+}$  channel involved in sperm-induced fertilization. *Science* **261** (5120): 484-486.
- Kusano, K., Miledi, R. und Stinnakre, J. (1982). Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *Journal of Physiology - London* **328** : 143-170.
- Lacerda, A. E., Perez Reyes, E., Wei, X., Castellano, A. und Brown, A. M. (1994). T-type and N-type calcium channels of *Xenopus* oocytes: evidence for specific interactions with  $\beta$  subunits. *Biophysical Journal* **66** (6): 1833-1843.
- Lane, J. W., McBride, D. W., Jr. und Hamill, O. P. (1991). Amiloride block of the mechanosensitive cation channel in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology - London* **441** : 347-366.
- Lane, J. W., McBride, D. W., Jr. und Hamill, O. P. (1992). Structure-activity relations of amiloride and its analogues in blocking the mechanosensitive channel in *Xenopus* oocytes. *British Journal of Pharmacology* **106** (2): 283-286.



- Leech, C. A. und Habener, J. F. (1997). Insulinotropic glucagon-like peptide-1-mediated activation of non-selective cation currents in insulinoma cells is mimicked by maitotoxin. *Journal of Biological Chemistry* **272** (29): 17987-17993.
- Letz, B., Ackermann, A., Canessa, C. M., Rossier, B. C. und Korbmayer, C. (1995). Amiloride-sensitive sodium channels in confluent M-1 mouse cortical collecting duct cells. *Journal of Membrane Biology* **148** (2): 127-141.
- Lifton, R. P. (1996). Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* **272** (5262): 676-680.
- Light, D. B., McCann, F. V., Keller, T. M. und Stanton, B. A. (1988). Amiloride-sensitive cation channel in apical membrane of inner medullary collecting duct. *American Journal of Physiology* **255** (2 Pt 2): F278-F286.
- Lii, T., Lee, H. C., Gleason, F. K. und Levitt, D. G. (1996). Characterization of a large conductance, cation-selective channel from sea urchin eggs that is sensitive to sulfhydryl reducing agents. *Journal of Membrane Biology* **150** (1): 27-35.
- Lingueglia, E., Renard, S., Waldmann, R., Voilley, N., Champigny, G., Plass, H., Lazdunski, M. und Barbry, P. (1994). Different homologous subunits of the amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel are differently regulated by aldosterone. *Journal of Biological Chemistry* **269** (19): 13736-13739.
- Lomax, R. B., Herrero, C. J., Garcia Palomero, E., Garcia, A. G. und Montiel, C. (1998). Capacitative Ca<sup>2+</sup> entry into *Xenopus* oocytes is sensitive to omega-conotoxins GVIA, MVIIA and MVIIC. *Cell Calcium* **23** (4): 229-239.
- Lu, L., Montrose Rafizadeh, C., Hwang, T. C. und Guggino, W. B. (1990). A delayed rectifier potassium current in *Xenopus* oocytes. *Biophysical Journal* **57** (6): 1117-1123.
- MacDonald, P., MacKenzie, S., Ramage, L., Seckl, J. und Brown, R. (2000). Corticosteroid regulation of amiloride-sensitive sodium-channel subunit mRNA expression in mouse kidney. *Journal of Endocrinology* **165** (1): 25-37.

- MacKay, K., Striker, L. J., Elliot, S., Pinkert, C. A., Brinster, R. L. und Striker, G. E. (1988). Glomerular epithelial, mesangial, and endothelial cell lines from transgenic mice. *Kidney International* **33** : 677-684.
- Mall, M., Bleich, M., Greger, R., Schreiber, R. und Kunzelmann, K. (1998). The amiloride-inhibitable Na<sup>+</sup> conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *Journal of Clinical Investigation* **102** (1): 15-21.
- Marunaka, Y. (1996). Amiloride-blockable Ca<sup>2+</sup>-activated Na<sup>+</sup>-permeant channels in the fetal distal lung epithelium. *Pflügers Archiv* **431** (5): 748-756.
- Masilamani, S., Kim, G. H., Mitchell, C., Wade, J. B. und Knepper, M. A. (1999). Aldosterone-mediated regulation of ENaC  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunit proteins in rat kidney. *Journal of Clinical Investigation* **104** (7): R19-R23.
- Mastroberardino, L., Spindler, B., Forster, I., Loffing, J., Assandri, R., May, A. und Verrey, F. (1998). Ras pathway activates epithelial Na<sup>+</sup> channel and decreases its surface expression in *Xenopus* oocytes. *Molecular Biology of the Cell* **9** (12): 3417-3427.
- Matsushita, K., McCray, P. B., Jr., Sigmund, R. D., Welsh, M. J. und Stokes, J. B. (1996). Localization of epithelial sodium channel subunit mRNAs in adult rat lung by in situ hybridization. *American Journal of Physiology* **271** (2 Pt 1): L332-L339.
- May, A., Puoti, A., Gaeggeler, H. P., Horisberger, J. D. und Rossier, B. C. (1997). Early effect of aldosterone on the rate of synthesis of the epithelial sodium channel  $\alpha$  subunit in A6 renal cells. *Journal of the American Society of Nephrology* **8** (12): 1813-1822.
- McNicholas, C. M. und Canessa, C. M. (1997). Diversity of channels generated by different combinations of epithelial sodium channel subunits. *Journal of General Physiology* **109** (6): 681-692.
- Merritt, J. E., Armstrong, W. P., et al. (1990). SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochemical Journal* **271** (2): 515-522.
- Methfessel, C., Witzemann, V., Takahashi, T., Mishina, M., Numa, S. und Sakmann, B. (1986). Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through en-

- dogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflügers Archiv* **407** (6): 577-588.
- Murata, M., Gusovsky, F., Yasumoto, T. und Daly, J. W. (1992). Selective stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  flux in cells by maitotoxin. *European Journal of Pharmacology* **227** (1): 43-49.
- Musgrave, I. F., Seifert, R. und Schultz, G. (1994). Maitotoxin activates cation channels distinct from the receptor-activated non-selective cation channels of HL-60 cells. *Biochemical Journal* **301** (Pt 2): 437-441.
- Nakhoul, N. L., Hering Smith, K. S., Gambala, C. T. und Hamm, L. L. (1998). Regulation of sodium transport in M-1 cells. *American Journal of Physiology* **275** (6 Pt 2): F998-F1007.
- Náray-Fejes-Tóth, A., Canessa, C., Cleaveland, E. S., Aldrich, G. und Fejes-Tóth, G. (1999). sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial  $\text{Na}^+$  channels. *Journal of Biological Chemistry* **274** (24): 16973-16978.
- Neher, E. (1992). Cell physiology. Controls on calcium influx. *Nature* **355** (6358): 298-299.
- Nishio, M., Muramatsu, I. und Yasumoto, T. (1996).  $\text{Na}^+$ -permeable channels induced by maitotoxin in guinea-pig single ventricular cells. *European Journal of Pharmacology* **297** (3): 293-298.
- Ott, M. (1999). Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC) durch die volumenregulierte Kinase h-sgk. *Inaugural Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen*
- Palmer, L. G. (1982). Ion selectivity of the apical membrane Na channel in the toad urinary bladder. *Journal of Membrane Biology* **67** (2): 91-98.
- Palmer, L. G. (1992). Epithelial Na channels: function and diversity. *Annual Review of Physiology* **54** : 51-66.
- Palmer, L. G., Antonian, L., Frindt, G. (1993). Regulation of the  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pump of the rat cortical collecting tubule by aldosterone. *Journal of General Physiology* **102** (1): 43-57

- Pesando, D., Girard, J. P., Durand Clement, M., Payan, P. und Puiseux Dao, S. (1991). Effect of maitotoxin on sea urchin egg fertilization and on  $\text{Ca}^{2+}$  permeabilities of eggs and intracellular stores. *Biology of the Cell* **72** (3): 269-273.
- Renard, S., Voilley, N., Bassilana, F., Lazdunski, M. und Barbry, P. (1995). Localization and regulation by steroids of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits of the amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  channel in colon, lung and kidney. *Pflügers Archiv* **430** (3): 299-307.
- Sayegh, R., Auerbach, S. D., Li, X., Loftus, R. W., Husted, R. F., Stokes, J. B. und Thomas, C. P. (1999). Glucocorticoid induction of epithelial sodium channel expression in lung and renal epithelia occurs via trans-activation of a hormone response element in the 5'-flanking region of the human epithelial sodium channel  $\alpha$  subunit gene. *Journal of Biological Chemistry* **274** (18): 12431-12437.
- Schild, L., Canessa, C. M., Shimkets, R. A., Gautschi, I., Lifton, R. P. und Rossier, B. C. (1995). A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92** (12): 5699-5703.
- Schreiber, R., Hopf, A., Mall, M., Greger, R. und Kunzelmann, K. (1999). The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial  $\text{Na}^+$  channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** (9): 5310-5315.
- Shigaev, A., Asher, C., Latter, H., Garty, H. und Reuveny, E. (2000). Regulation of *sgk* by aldosterone and its effects on the epithelial  $\text{Na}^+$  channel. *American Journal of Physiology* **278** (4): F613-F619.
- Shimkets, R. A., Lifton, R. und Canessa, C. M. (1998). In vivo phosphorylation of the epithelial sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** (6): 3301-3305.
- Sladeczek, F., Schmidt, B. H., Alonso, R., Vian, L., Tep, A., Yasumoto, T., Cory, R. N. und Bockaert, J. (1988). New insights into maitotoxin action. *European Journal of Biochemistry* **174** (4): 663-670.

- Smith, P. R., Mackler, S. A., Weiser, P. C., Brooker, D. R., Ahn, Y. J., Harte, B. J., McNulty, K. A. und Kleyman, T. R. (1998). Expression and localization of epithelial sodium channel in mammalian urinary bladder. *American Journal of Physiology* **274** (1 Pt 2): F91-F96.
- Snyder, P. M., Cheng, C., Prince, L. S., Rogers, J. C. und Welsh, M. J. (1998). Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits. *Journal of Biological Chemistry* **273** (2): 681-684.
- Soergel, D. G., Yasumoto, T., Daly, J. W. und Gusovsky, F. (1992). Maitotoxin effects are blocked by SK&F 96365, an inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Molecular Pharmacology* **41** (3): 487-493.
- Spindler, B., Mastroberardino, L., Custer, M. und Verrey, F. (1997). Characterization of early aldosterone-induced RNAs identified in A6 kidney epithelia. *Pflügers Archiv* **434** (3): 323-331.
- Staub, O., Dho, S., Henry, P., Ishikawa, T., McGlade, J. und Rotin, D. (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na<sup>+</sup> channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO Journal* **15** : 2371-2380.
- Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L. und Rotin, D. (1997). Regulation of stability and function of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) by ubiquitination. *EMBO Journal* **16** : 6325-6336.
- Stokes, J. B. und Sigmund, R. D. (1998). Regulation of rENaC mRNA by dietary NaCl and steroids: organ, tissue, and steroid heterogeneity. *American Journal of Physiology* **274** (6 Pt 1): C1699-C1707.
- Stoos, B. A., Náráy-Fejes-Tóth, A., Carretero, O. A., Ito, S. und Fejes-Tóth, G. (1991). Characterization of a mouse cortical collecting duct cell line. *Kidney International* **39** (6): 1168-1175.
- Taglietti, V. und Toselli, M. (1988). A study of stretch-activated channels in the membrane of frog oocytes: interactions with Ca<sup>2+</sup> ions. *Journal of Physiology - London* **407** : 311-328.

- Takahashi, M., Tatsumi, M., Ohizumi, Y. und Yasumoto, T. (1983). Ca<sup>2+</sup> channel activating function of maitotoxin, the most potent marine toxin known, in clonal rat pheochromocytoma cells. *Journal of Biological Chemistry* **258** (18): 10944-10949.
- Tokimasa, T. und North, R. A. (1996). Effects of barium, lanthanum and gadolinium on endogenous chloride and potassium currents in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology - London* **496** (Pt 3): 677-686.
- Vallet, V., Chraïbi, A., Gaeggeler, H. P., Horisberger, J. D. und Rossier, B. C. (1997). An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* **389** (6651): 607-610.
- Venant, A., Dazy, A. C., Diogene, G., Metezeau, P. und Marano, F. (1994). Effects of maitotoxin on calcium entry and phosphoinositide breakdown in the rabbit ciliated tracheal epithelium. *Biology of the Cell* **82** (2-3): 195-202.
- Verkman, A. S., van Hoek, A. N., Ma, T., Frigeri, A., Skach, W. R., Mitra, A., Tamarappoo, B. K. und Farinas, J. (1996). Water transport across mammalian cell membranes. *American Journal of Physiology* **270** (1 Pt 1): C12-C30.
- Verrey, F. (1999). Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *American Journal of Physiology* **277** : F319-F327.
- Volk, T., Frömter, E. und Korbmacher, C. (1995). Hypertonicity activates nonselective cation channels in mouse cortical collecting duct cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92** (18): 8478-8482.
- Vuagniaux, G., Vallet, V., et al. (2000). Activation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by the serine protease mCAP1 expressed in a mouse cortical collecting duct cell line. *Journal of the American Society of Nephrology* **11** (5): 828-834.
- Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Voilley, N. und Lazdunski, M. (1995). Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel. *Journal of Biological Chemistry* **270** (46): 27411-27414.
- Wang, X. und Horisberger, J. D. (1997). Palytoxin effects through interaction with the Na,K-ATPase in *Xenopus* oocyte. *FEBS Letters* **409** (3): 391-395.

- Weber, W. M. (1999). Endogenous ion channels in oocytes of *Xenopus laevis*: recent developments. *Journal of Membrane Biology* **170** (1): 1-12.
- Weber, W. M., Liebold, K. M. und Clauss, W. (1995). Amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  conductance in native *Xenopus* oocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1239** (2): 201-206.
- Weber, W. M., Liebold, K. M., Reifarth, F. W. und Clauss, W. (1995). The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced leak current in *Xenopus* oocytes is indeed mediated through a  $\text{Cl}^-$  channel. *Journal of Membrane Biology* **148** (3): 263-275.
- White, M. M. und Aylwin, M. (1990). Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels in *Xenopus* oocytes. *Molecular Pharmacology* **37** (5): 720-724.
- Worley, J. F., 3rd, McIntyre, M. S., Spencer, B. und Dukes, I. D. (1994). Depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores activates a maitotoxin-sensitive nonselective cationic current in  $\beta$ -cells. *Journal of Biological Chemistry* **269** (51): 32055-32058.
- Yang, X. C. und Sachs, F. (1989). Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science* **243** (4894 Pt 1): 1068-1071.
- Yang, X. C. und Sachs, F. (1990). Characterization of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology - London* **431** : 103-122.
- Yao, Y. und Tsien, R. Y. (1997). Calcium current activated by depletion of calcium stores in *Xenopus* oocytes. *Journal of General Physiology* **109** (6): 703-715.
- Zhang, Y., McBride, D. W., Jr. und Hamill, O. P. (1998). The ion selectivity of a membrane conductance inactivated by extracellular calcium in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology - London* **508** (Pt 3): 763-776.

---

## Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**„UNTERSUCHUNG AMILORID-SENSITIVER KATIONENSTRÖME IN XENOPUS LAEVIS OOZYTEN:  
ENDOGENER MTX-AKTIVIERTER KATIONENKANAL UND EXOGENER EPITHELIALER NATRIUMKANAL“**

im Institut für Physiologie II

Zentrum der Physiologie

Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

unter Leitung von Prof. Dr. E. Frömter

mit Unterstützung durch PD Dr. C. Korbmacher und Dr. A. Bielfeld-Ackermann

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde (oder wird) in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:  
Wiener Klinische Wochenschrift, Physiologist und Pflügers Archiv

Frankfurt am Main, den 16.06.2000

*Christine Range*



---

## Lebenslauf

### *Persönliche Daten*

Nachname	Range
Vorname	Christine
Geburtsdatum	11.05.1974
Geburtsort	Kassel
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

### *Schulbildung*

1980-1983	Friedensschule Waiblingen-Neustadt
1983-1992	Salier-Gymnasium Waiblingen
Mai 1992	Allgemeine Hochschulreife

### *Universität*

*Studium der Humanmedizin  
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main*

01.10.92-30.09.94	Vorklinischer Teil des Studiums
20.09.94	Ärztliche Vorprüfung
01.10.94-02.11.99	Klinischer Teil des Studiums
29.08.95	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
30.03.98	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
26.10.98-11.04.99	Praktisches Jahr, Abschnitt in den Fächern Chirurgie und Innere Medizin am Markus-Krankenhaus Frankfurt/ Main
12.04.99-06.06.99	Praktisches Jahr, Abschnitt im Fach Innere Medizin am Bezirksspital Oberhasli, Meiringen, Schweiz
07.06.99-24.10.99	Praktisches Jahr, Abschnitt in den Fächern Anästhesiologie und Innere Medizin am Markus-Krankenhaus Frankfurt/ Main
02.11.99	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

*Wissenschaftliche  
Tätigkeit*

15.10.95-15.11.97

Forschungsprojekt für die Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.) am Institut für Nieren- und Membranphysiologie, Zentrum der Physiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/ Main

*Veröffentlichungen*

1998

Maitotoxin (MTX) activates a nonselective cation channel in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Archiv* 436: 329-337

1997 (Abstract)

Coinjection of mRNA from M-1 mouse CCD cells with cRNA of  $\beta$  and  $\gamma$ -rENaC in *Xenopus* Oocytes enhances the expression of amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  currents. *Pflügers Archiv* 433 (Suppl. 6): R163

1997 (Abstract)

Regulation of the amiloride sensitive  $\text{Na}^+$  channel in M-1 mouse cortical collecting duct (CCD) cells. *Physiologist* 40: A-10

1997 (Abstract)

Coinjection of mRNA from M-1 mouse cortical collecting duct cells with cRNA of  $\beta$ -and  $\gamma$ -rENaC in *Xenopus* oocytes enhances the expression of amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  currents. *Wiener Klinische Wochenschrift* 109: 514-115

Frankfurt am Main, den 16.06.2000

*Christine Range*