



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Wirkung des TIP-Peptids AP318 über SGK1
auf den epithelialen Natriumkanal“

verfasst von / submitted by

Burak ALTIPARMAK

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

Wien, 2018 / Vienna, 2018

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

A 449

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

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

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

Danksagung

Diese Arbeit wurde auf dem Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien im Zeitraum zwischen September 2017 und Jänner 2018 erstellt.

In erster Linie gebührt ein ganz besonderer Dank Frau Prof. Rosa Lemmens-Gruber für die Ermöglichung dieser Arbeit und ihren Beistand.

Weiters möchte ich mich herzlichst bei Dr. Mohammed Aufy für seine permanente Unterstützung und seine große Hilfsbereitschaft bei meiner praktischen Arbeit bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei allen Diplomanden des Departments für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Außerdem will ich meinen Freunden und Studienkollegen meinen Dank äußern, die mich stets unterstützen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meinen Geschwistern für ihre endlose Liebe und Unterstützung während meines Studiums bedanken.

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

Inhaltsverzeichnis

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>6</u>
<u>Kurzzusammenfassung</u>	<u>7</u>
<u>Abstract</u>	<u>8</u>
<u>Zielsetzung</u>	<u>9</u>
<u>1. Einführung</u>	
1.1 ENaC	10
1.1.1 Aufbau	11
1.1.2 Vorkommen und Funktion	12
1.1.3 Regulation	13
1.2 Tumornekrosefaktor(α)	15
1.3 AP318	16
1.4 Erkrankungen	
1.4.1 Liddle-Syndrom	18
1.4.2 Pseudohypoaldosteronismus Typ 1	19
<u>2. Materialien</u>	<u>21</u>

3. Methoden	
3.1 Zellkultur	25
3.2 Wirkstoffbehandlung	26
3.3 Western Blot	28
4. Ergebnisse	
4.1 SGK p-Serin 422	34
4.2 SGK p-Serin 78	35
4.3 SGK (C-Term.)	37
4.4 SGK (N-Term.)	38
4.5 Anti phospo SGK 1	40
Diskussion	42
Zusammenfassung	44
Abbildungsverzeichnis	46
Literaturverzeichnis	48

Abkürzungsverzeichnis

A549	Lungenadenokarzinom-Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
ASIC	Acid-Sensing Ion Channel
AFC	alveoläre Flüssigkeitsclearance
BSA	bovines Serum Albumin
EGF	Epidermal Growth Factor
ENaC	epithelialer Natriumkanal
dH ₂ O	destilliertes Wasser
EC50	mittlere effektive Konzentration
FBS	Fetales Bovines Serum
GILZ	Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
IRS	Insuline Receptor Substrat
kDa	kilo Dalton
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA1B	Pseudohypoaldosteronismus Typ 1B
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
P/S	Penicillin/Streptomycin
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute - Medium
SCNN	not voltage-gated Sodium Channel Non Neuronal
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel
SGK1	Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline + Tween
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TNF(α)	Tumornekrosefaktor(alpha)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Wt	Wildtyp

Kurzzusammenfassung:

Die Lektin-ähnliche Domäne des Tumornekrosefaktors(α) aktiviert den Amilorid-sensitiven, epithelialen Natriumkanal ENaC. Der Kanal ist beim Menschen aus vier Untereinheiten (α , β , γ , δ) aufgebaut und kommt unter anderem in der Lunge, Niere, Dickdarm und weiteren Organen vor. Dieser ermöglicht die Regulierung des Natriumhaushalts und Blutdrucks. Dysfunktionen des Kanals und Mutationen in den Untereinheiten führen zu Ödemen und lebensbedrohlichen Erkrankungen wie Pseudohypoaldosteronismus Typ 1B und Liddle-Syndrom.

AP318 ist ein synthetisch entwickeltes TIP-Peptid, das die Lektin-ähnliche Domäne des TNF(α) nachahmt. Es bindet an die Untereinheit des Kanals und erhöht dessen Expression.

Zu diesem Zweck wurde die Wirkung von AP318 auf Wildtyp-ENaC mittels Western-Blot Verfahren analysiert. Nachdem die Lungenkarzinomzellen mit dem Wirkstoff behandelt worden sind, wurden mehrere Gelelektrophoresen durchgeführt. Schließlich endete die Analyse mit Auswertungen der erhaltenen Ergebnisse aus den Blots.

Die Ergebnisse zeigen bei längerer Einwirkzeit bis 120 Minuten eine durch AP318 erhöhte Expression des Kanals über Aktivierung einer Subfamilie des Serin/Threonin-Kinasen Signalwegs. Die erhöhte Aktivität scheint sich nach 60 Minuten konstant zu halten.

Schlagwörter:

ENaC – AP318 - TNF(α) – Liddle Syndrom – PHA1B – Western Blot

Abstract:

The Lectin-like domain of tumor necrosis factor (α) stimulates the Amilorid-sensitive epithelial sodium-channel called ENaC. In human body, the channel is build up out of four subunits (α , β , γ , δ) and is present in lung, kidney, colon and other organs. ENaC is essential for the regulation of sodium balance and blood pressure. Dysfunctions of the channel and mutations in the subunits lead to edema and life-threatening diseases like pseudohypoaldosteronism type 1B and Liddle-Syndrome. AP318 is a synthetically created TIP-peptide, which is imitating the Lectin-like domain of TNF(α). It binds to the subunit of the epithelial sodium channel and enhances the expression of it.

For this purpose, the effect of AP318 was analysed on wildtype-ENaC via Western Blot technique. After finishing the treatment of lung carcinoma cells, several gel electrophoreses were performed. Eventually, the analysis was concluded with the interpretation of the results.

After increased exposure time up to 120 minutes, the results show a higher expression of the channel due to activation of a subfamily of serine/threonine kinase signaling pathway. The increased activity seems to remain constant after 60 minutes.

keywords:

ENaC – AP318 - TNF(α) – Liddle Syndrom – PHA1B – Western Blot

Zielsetzung

Ziel dieser Studienabschlussarbeit ist es einen Überblick über den Effekt des Wirkstoffs AP318 auf den SGK1-Signalweg und infolgedessen auf den epithelialen Natriumkanal (ENaC) zu verschaffen. Allerdings ist der Fokus auf den Wildtyp-ENaC gerichtet. Ausgehend von früheren Versuchen mit Lungenkarzinomzellen (A549), die ENaC überexprimieren, wird die Wirkung vom TIP-Peptid AP318 über den Signalweg untersucht. Das Ziel ist herauszufinden, ob es durch Aktivierung des Signalwegs zu einer Erhöhung der Expression von ENaC kommt und demnach möglicherweise eine Wirkung auf nicht-kardiale Lungenödeme gegeben ist. Der Wirkmechanismus von AP318 sollte mit der Leitsubstanz AP301 (Solnatid) verglichen werden. Solnatid bewirkte in vitro eine erhöhte Expression von ENaC und zeigte im Tiermodell und in klinische Phase 2a – Studien seine Wirksamkeit beim nicht-kardialen Lungenödem. Die Einwirkzeit des Wirkstoffs AP318 wurde maximal als 120 Minuten festgelegt.

Die Diplomarbeit beinhaltet in der Einführung den wissenschaftlichen Hintergrund des Themas. Das Kapitel veranschaulicht die Funktion von dem epithelialen Natriumkanal und seinen Signalwegen, Tumornekrosefaktor (α), TIP-Peptid AP318 und zusammenhängenden Erkrankungen. Anschließend werden die verwendeten Materialien und Methoden geschildert. Bei den Methoden wird auf die Zellkultur und den Western Blot näher eingegangen.

Im weiteren Verlauf werden die Resultate ausgewertet und ersichtlich dargestellt. Am Ende der Arbeit ist eine Schlussbemerkung über das Thema und die Ergebnisse zu lesen.

1. Einführung:

1.1 Epithelialer Natriumkanal:

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC; Sodium Channel Non-Neuronal 1 (SCNN1)), auch genannt Amilorid-sensitiver Natriumkanal (ASSC), zählt zur Familie der nicht spannungsabhängigen Ionenkanäle „ENaC / Degenerin“ (Waldmann et al., 1998; Kellenberger und Schild, 2015; Eastwood et al., 2012). Ein Mitglied dieser Familie sind auch Acid-sensing Ion Channels (ASICs), die mit neurologischen Krankheiten in Verbindung gebracht werden (Sluka et al., 2009). Die ENaC/Degenerin - Superfamilie hat einen charakteristischen Aufbau mit ihrer extrazellulären und intrazellulären Region. Der extrazelluläre Teil der Untereinheit verbindet zwei Transmembrandomänen, die durch die Zellmembran gehen (siehe Abbildung 1). Im Inneren der Zelle befinden sich kurze N- und C-Termini, wobei am Carboxy-Terminus die Prolinsequenz („PY-Motiv“) hängt (Hanukoglu und Hanukoglu, 2016). Das PY-Motiv dient als Bindungsstelle für die Ubiquitin-Proteinligase (Nedd4-2), die zur Degradation von ENaC auf der Zelloberfläche führt (Lu et al., 2007).

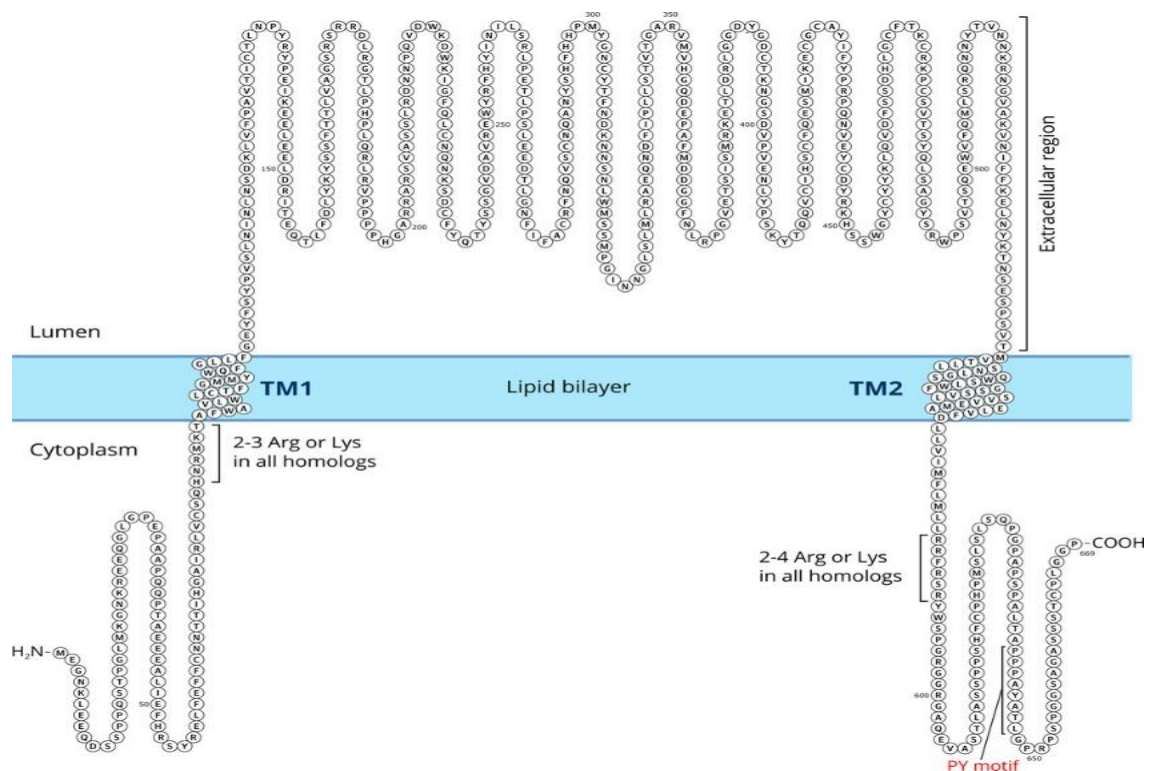


Abb.[1]: Aufbau einer Untereinheit (Hanukoglu und Hanukoglu, 2016)

1.1.1 Aufbau:

Der Amilorid-sensitive Natriumkanal ist ein trimere Komplex aus $\alpha\beta\gamma$ - oder $\delta\beta\gamma$ -Untereinheiten (Firsov et al.,1998; Stockand et al.,2008, Eaton et al.,2009).

Die α und δ – Einheiten bestimmen die Größe der Kanalpore, während die anderen zwei der Expression des Kanals beitragen (Sheng et al.,2001; Konstas et al.,2003). Alle Untereinheiten bestehen aus zwei Transmembransegmenten (TM1 und TM2), die über eine Schleife im extrazellulären Raum verbunden sind und durch die Lipidmembran gehen. Im intrazellulären Raum hängt am Carboxy-Terminus der α -, β -, γ -Untereinheiten die Prolinsequenz, die unabhängig von Aldosteron die ENaC Aktivität reguliert (Loffing et al.,2005; Lu et al.,2007).

Mutationen in diesem PY-Motiv werden als Ursache für die autosomal-dominante Nierenkrankheit „Liddle’s Syndrom“ angenommen (Hansson et al.,1995; Shimkets et al.,1994).

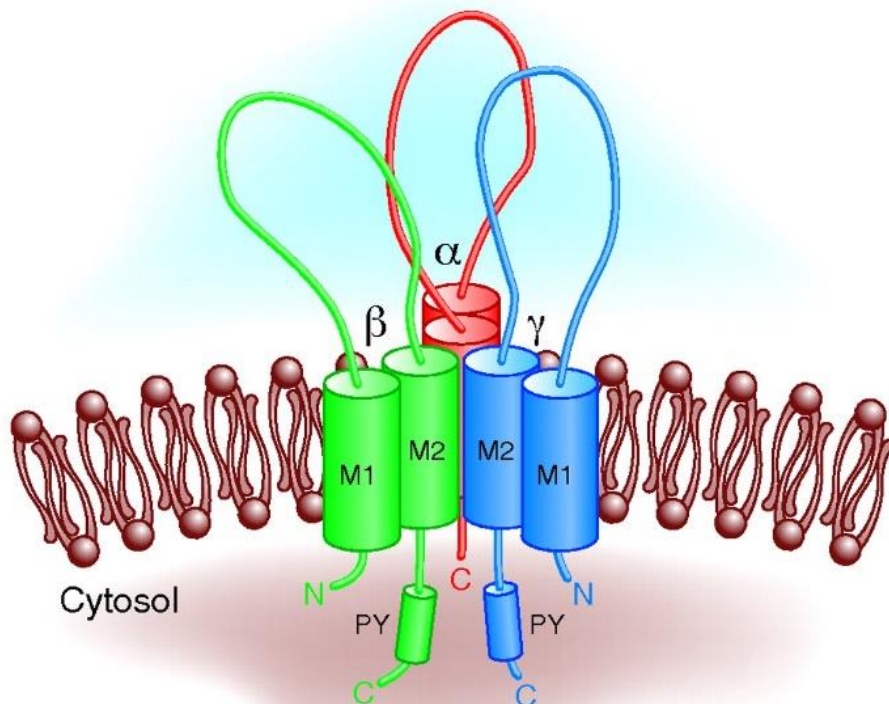


Abb.[2]: ENaC mit seinen Untereinheiten (Bhalla et al.,2008)

Im menschlichen Körper werden die vier Untereinheiten des ENaC's von vier Genen „SCNN1“ (= not voltage-gated Sodium Channel Non Neuronal) codiert.

SCNN1A (A=alpha) codiert für die α -Untereinheit und befindet sich auf dem 12p-Chromosom. Die β -und γ -Untereinheiten werden von den zwei SCNN1B(B=beta) und SCNN1G (G=gamma) – Genen, die auf dem 16p-Chromosom lokalisiert sind, codiert. Zu guter Letzt ist das SCNN1D (D=delta)-Gen beim Menschen auf dem 1p-Chromosom zu finden, das für die δ -Untereinheit zuständig ist. Die vierte Untereinheit (δ) konnte bei den Mäusen nicht festgestellt werden (Giraldez et al., 2012; Voilley et al., 2014; Voilley et al., 2015; Shimkets et al., 1994). Mutationen in den SCNN1A, SCNN1B und SCNN1G – Genen führen zur autosomal-rezessiven Erkrankung „Pseudohypoaldosteronismus Typ 1B“ (Hanukoglu 1991, Riepe et al., 2009).

1.1.2 Vorkommen und Funktion:

Der Kanal ist in der Apikalmembran von Epithelien der Lunge, Niere, Dickdarm, Speicheldrüsen, Schweißdrüsen und Haut zu finden und ist permanent durchlässig für den Natrium-Ionenstrom (Na^+) (Garty und Palmer, 1997; Greig et al., 2003; Kashlan et al., 2011). Die δ -Untereinheit beim Menschen kommt im Gegensatz zu den anderen Untereinheiten des ENaCs vermehrt im Pankreas, Gehirn, Testis, Eierstock, Auge und Nasenschleimhaut vor (Waldmann et al., 1995; Krueger et al., 2012; Bangel-Ruland et al., 2010).

In der Regel fließen Natriumionen vom Lumen durch die Apikalmembran in die Epithelzellen und werden mithilfe der Na^+ - K^+ -ATPase aus der Zelle in die Blutgefäße befördert (Kellenberger und Schild, 2015). Der Wasserabtransport in der Lunge erfolgt über die Aquaporine (Wasserkanäle), die in alveolären Epithelzellen (Pneumozyten Typ1) vorkommen (Johnson et al., 2006; Kreda et al., 2001). Diese Lungenzellen sind für den Gasaustausch zwischen Atemluft und Blut zuständig (Fischbarg et al., 2010). Die alveoläre Flüssigkeitsclearance (AFC) wird von ENaC und der Na^+ - K^+ -ATPase reguliert (Ridge et al., 2003).

Bei Dysfunktionen des Natriumionen-Transports kann es während einer Lungenentzündung oder Lungenverletzung zu Lungenödemen kommen (Egli et al.,2004).

Eine weitere Funktion ist die Aufrechterhaltung des Blutdrucks und der extrazellulären Flüssigkeit, wobei die Aktivität von ENaC unter der Kontrolle von Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) steht (Rossier et al.,2015; Büsst,2013; Bhalla und Hallows, 2008).

1.1.3 Regulation:

ENaC lässt sich durch verschiedene Mechanismen regulieren, die noch nicht vollständig erforscht sind. Ein Beispiel ist die Regulation von ENaC durch das Mineralcorticoidhormon Aldosteron, das in der Nebennierenrinde produziert wird. Das Aldosteron bindet an den Mineralcorticoidrezeptor (MR) und aktiviert dadurch im Zellkern Proteinkinasen wie SGK1 (serum and glucocorticoid-regulated kinase 1) (siehe Abbildung 3) (Bhargava et al.,2004;Yiyun et al.,2016).

SGK1 kann direkt an die α -Untereinheit von Amilorid-sensitivem Natriumkanal andocken und diese phosphorylieren (siehe Abbildung 3), das in der Folge zu einer erhöhten Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals führt (Yiyun et al.,2016; Diakov et al.,2004).

SGK1 kann aber auch in Abhängigkeit von GILZ1 (Glucocorticoid-induced Leucine zipper 1 Kinase) als Komplex die Ubiquitin-Proteinligase (Nedd4-2) durch Phosphorylierung inhibieren (siehe Abbildung 3). Dies führt dazu, dass Nedd4-2 am Carboxy-Terminus der α , β und γ - Unterheiten nicht ubiquitinieren und den Natriumkanal nicht zur Degradierung durch Lysosome leiten kann. Demzufolge steigt die Expression von ENaC (Zhou et al.2007; Debonneville et al.,2001; Bhalla et al.,2005).

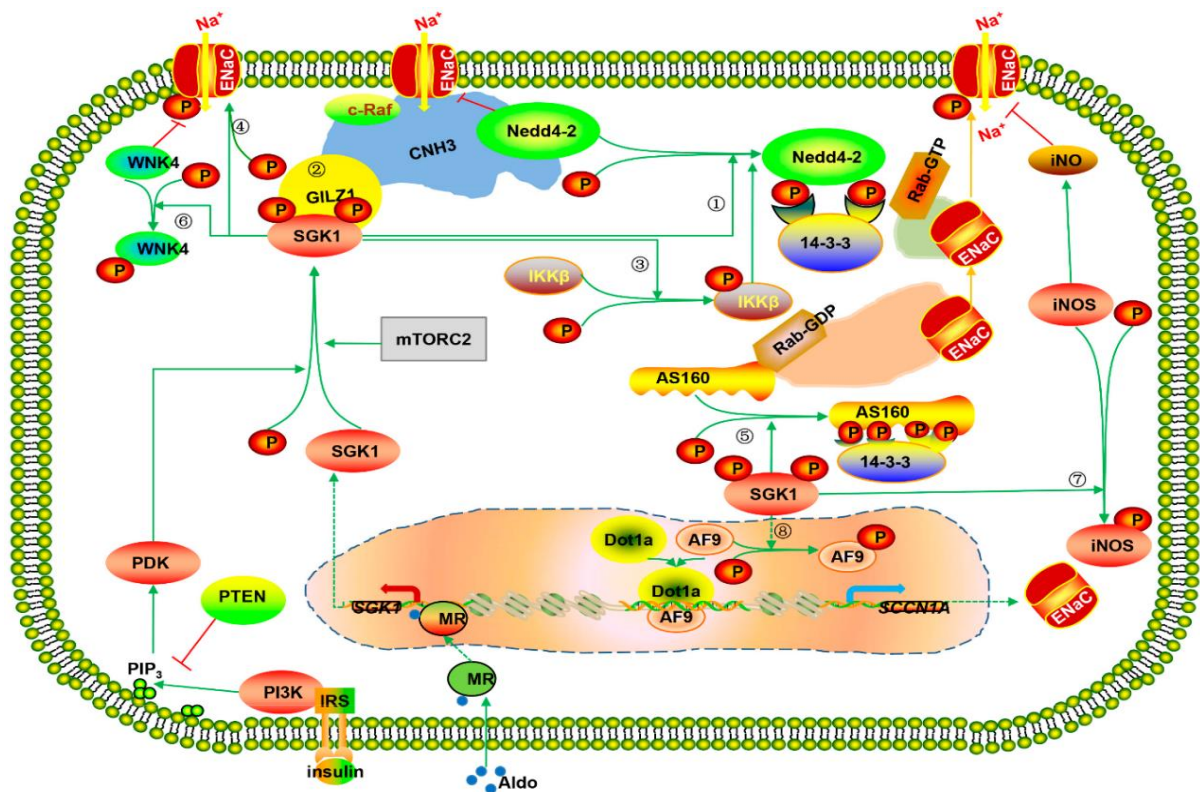


Abb.[3]: SGK1-abhängige Regulation von ENaC. **1)** SGK1 phosphoryliert Nedd4-2, verhindert die Ubiquitinierung und Degradation von ENaC; **2)** SGK1 bildet einen Komplex mit GILZ1 und phosphoryliert Nedd4-2; **3)** SGK1 phosphoryliert direkt die α -Untereinheit von ENaC; **4)** **Aldosteron** bindet an MR und aktiviert SGK1 im Zellkern; **5)** **Insulin** aktiviert PI3K über IRS, wodurch PIP2 zu PIP3 phosphoryliert wird. PDK und mTor aktivieren SGK1; GILZ1 (Glucocorticoid-induced Leucine zipper 1 Kinase), SGK1 (Serum and Glucocorticoid-regulated kinase 1), MR (Mineralcorticoid Rezeptor), PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase), IRS (Insulin Receptor Substrat), Aldo (Aldosteron), P (Phosphat), PDK (Phosphoinositide-dependent kinase), PIP3 (Phosphatidylinositoltrisphosphat) (Yiyun et al., 2016).

Ein weiterer Mechanismus, der mit der ENaC-Aktivität in Zusammenhang steht, ist der PI3K/Akt-Signalweg. PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) ist ein Enzym, das in vielen lebenswichtigen Prozessen wie Zellwachstum und Zellproliferation beim Menschen eine Schlüsselrolle spielt. Auf der anderen Seite wird es auch mit verschiedenen Krankheiten wie Diabetes, nicht-alkoholische Fettleber und Krebs in Verbindung gebracht (Fruman et al., 1998; Katso et al., 2001; Matsuda et al., 2013).

Es wird durch Insulin über IRS (Insuline Receptor Substrat) oder Wachstumsfaktoren wie EGF (Epidermal Growth Factor) aktiviert, wodurch das PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat) in der Zelle phosphoryliert wird (Ruderman et al.,1990; Shah et al.,2006).

Im weiteren Verlauf werden Akt (Proteinkinase B, PKB), die für verschiedene Zellaufgaben zuständig ist, und SGK1 durch Phosphoinositide-dependent kinase (PDK) / mTor nachgeschaltet (siehe Abbildung 3) (Alessi et al.,1998; Manning et al., 2007, Lee et al.,2008). Nach Aktivierung von SGK1 steigt die Expression von Amilorid-sensitivem Natriumkanal und der Na⁺-Transport (Debonneville et al.,2001;Bhalla et al.,2005).

1.2 Tumornekrosefaktor- α (alpha):

Der TNF- α gehört zu den Signalstoffen (Zytokinen) im menschlichen Körper, der an verschiedenen Vorgängen im Körper beteiligt ist.

Hauptsächlich werden sie von den Makrophagen produziert und aktivieren wiederum andere Zytokine, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind (Parameswaran et al.,2010).

Das Zytokin besteht aus drei identischen Untereinheiten, die jeweils eine Lektin-ähnliche Domäne besitzen (Tang et al., 1996). Diese Domänen sind von den Rezeptorbindungsstellen räumlich abgetrennt (siehe Abbildung 4) (Sherblom et al.,1988). Durch Bindung an die TNF-Rezeptoren 1 und 2 (p55 und p75) werden verschiedene Zellfunktionen wie Zellteilung, Zelldifferenzierung oder Zelltod reguliert.

Sie spielen auch eine Rolle bei Fieber und vielen Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Schuppenflechte, Diabetes Mellitus und Sepsis (Parameswaran et al.,2010; Vandenabeele et al.,1995; Declercq et al.,1998).

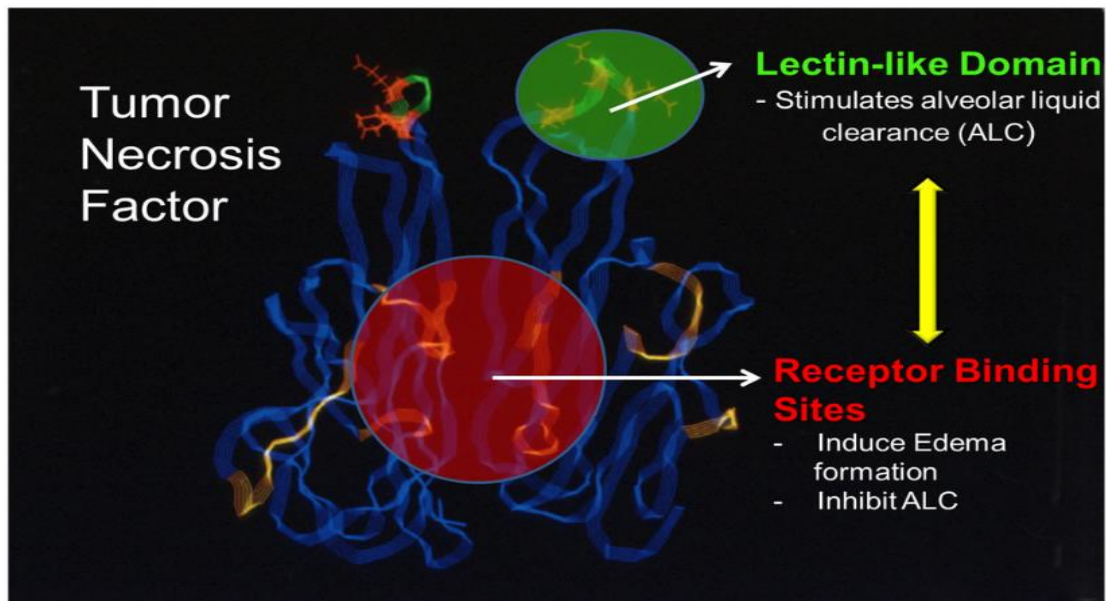


Abb.[4]: detaillierte Darstellung von TNF(α) (Lucas et al.,2013)

Es hat auch wesentliche Aufgaben bei der Aktivität von dem epithelialen Natriumkanal (ENaC). Über die Lektin-ähnliche Domäne kann TNF- α den Kanal stimulieren und die Ödem-Reabsorption in der Lunge begünstigen (Fukuda et al., 2001; Braun et al., 2005). Auf der anderen Seite kann er über seine Rezeptorbindungsstelle wiederum zur Wasseransammlung führen (Yamagata et al.,2009; Dagenais et al.,2004).

1.3 AP318:

Der Wirkstoff AP318 zählt zu den zyklischen TIP-Peptiden, die synthetisch zur möglichen Behandlung von nicht-kardialen Lungenödemen entwickelt worden sind. TIP-Peptide sind kleine Verbindungen, die die Lektin-ähnliche Domäne von TNF- α nachahmen und den epithelialen Natriumkanal aktivieren (Hazemi et al.,2010; Czikora et al.,2014).

In den 90er-Jahren wurde das erste TIP-Peptid AP301 (Solnatid) entwickelt (Lucas et al.,1994). Das Problem bei Solnatid ist eine Disulfidbrücke, die die Verbindung

instabil macht. Deshalb wurden weitere, stabilere TIP-Peptide entwickelt (Hazemi et al.,2010).

AP318 [Cyclo(4-aminobutanoic acid-GQRETPEGAEAKPWYD)] hat 17 Aminosäuren und unterscheidet sich von Solnatid durch Austausch der Cysteine (Cys1, Cys17) mit Asparaginsäure(Asp17) am C-Terminus und 4-Aminobuttersäure(Abu1) am N-Terminus. Dadurch entsteht bei einer Zyklisierung eine Amidbindung zwischen Abu1 und Asp17. Dies ist stabiler als die Disulfidbrücke von AP301 zwischen Cys1 und Cys17 (siehe Abbildung 5) (Hazemi et al.,2010; Shabbir et al.,2013).

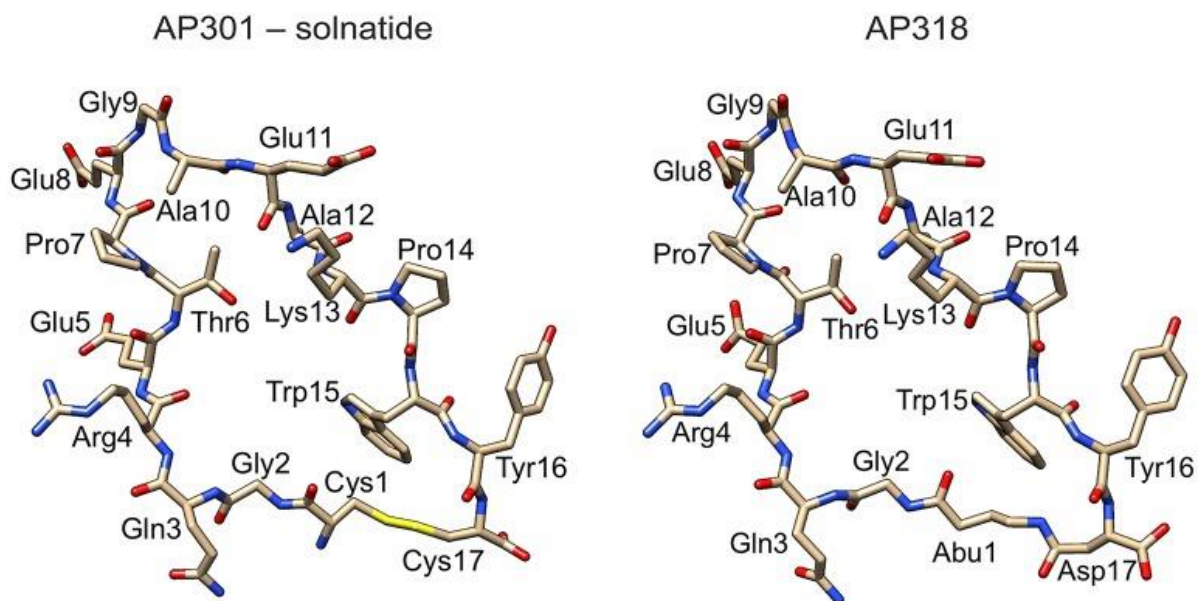


Abb.[5]: 3D-Darstellung der TIP-Peptide AP301 und AP318 (Willam et al.,2017)

Außerdem hat es eine negativ-geladene Carboxylgruppe in Position 17, die bestimmend für die Aktivierung von ENaC ist. Die positiv-geladene Aminogruppe am N-Terminus in Position 1 fehlt hier im Gegensatz zu seinem Vorgänger AP301, das an beiden Positionen eine Ladung aufweist. Bei manchen TIP-Peptiden kann sowohl die Carboxylgruppe, als auch die Aminogruppe ungeladen sein. Diese zeigen keinen Effekt auf den Amilorid-sensitiven Natriumkanal (Hazemi et al.,2010).

TIP-Peptide erhöhen die Aktivität von ENaC, aber haben keine Wirkung auf die Na⁺/K⁺-ATPase. Die Wirkung kommt durch Bindung an den Carboxy-Terminus der α -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals zustande. Klinische Prüfungen zeigen,

dass sie zur Reduktion des extravaskulären Lungenwassers führen und somit die Lungenfunktion verbessern (Lucas et al.,2016; Czikora et al.,2014).

AP318 (200nM) ist beim Wildtyp-ENaC (in Lungenkarzinomzelllinie A549 und exprimiert in HEK293-Zellen) und mutiertem ENaC (exprimiert in HEK293-Zellen) effektiver als AP301 (200nM). In den Patch-Clamp Versuchen zeigt es eine signifikant stärkere Aktivität und kleineren EC₅₀-Wert als sein Vorgänger. Deshalb kann angenommen werden, dass AP318 stärker als Solnatid auf ENaC wirkt (Hazemi et al.,2010; Willam et al.,2017).

Construct	Solnatide EC ₅₀ (nM)	AP318 EC ₅₀ (nM)
Wild type	52.4 ± 3.7	29.3 ± 4.4
αQ101K	64.5 ± 3.5 [*]	37.4 ± 1.7
αC133Y	74.0 ± 6.8 ^{***}	42.1 ± 2.4 ^{**}
αS243P	80.1 ± 12.9 ^{***}	49.3 ± 5.8 ^{***}
αG327C	50.2 ± 5.2	26.1 ± 2.9
αS562L	64.3 ± 6.3	46.4 ± 2.9 ^{***}
αS562P	61.1 ± 8.9	49.3 ± 3.1 ^{***}
αS243fs	72.8 ± 1.3 ^{**}	38.9 ± 6.5
βG37S	65.8 ± 3.2 [*]	36.7 ± 6.0
γV543fs	58.4 ± 7.9	47.7 ± 4.1 ^{***}

Abb.[6] : mittlere effektive Konzentrationen von AP301 (Solnatid) und AP318 in Wildtyp und Mutationen (Willam et al.,2017)

Active test compound	ENaC EC ₅₀ (nM)
TNF-α	8.2 ± 0.1
1	54.3 ± 0.8
3	56.0 ± 0.8
4	38.3 ± 1.7
5	45.5 ± 0.6
8	24.8 ± 0.5
9	19.9 ± 0.7

Abb.[7] : mittlere effektive Konzentrationen der TIP-Peptide[1=AP301; 8=AP318] (Hazemi et al.,2010)

1.4 Erkrankungen

1.4.1 Liddle-Syndrom:

Das Liddle - Syndrom ist eine seltene, autosomal-dominante Störung in den epithelialen Natriumkanälen der Niere, das sich durch Hypokaliämie, Bluthochdruck, metabolische Alkalose und niedrigem Reninspiegel äußert. Der Aldosteronspiegel kann normal oder erniedrigt sein (Findling et al., 1997; Hansson et al.,1995). Im Jahre 1963 wurde die Krankheit zum ersten Mal beschrieben (Liddle et al.,1963).

Eine Missense oder Frameshift-Mutation in den β , γ – Untereinheiten des ENaC's führt zur Erkrankung. Diese Mutationen veranlassen eine Veränderung oder einen Verlust der Aminosäuren in der Prolinsequenz („PY-Motiv“) der beiden Untereinheiten. Dies führt zu einer erhöhten Aktivität von ENaC und somit zu einer erhöhten Natrium-Wasserrückresorption (Furuhashi et al., 2005 ; Schild et al., 1996; Shimkets et al., 1994; Hiltunen et al., 2002).

Liddle-Syndrom tritt vermehrt bei Jugendlichen auf, die krankheitsbedingt über Hypertonie klagen (Wang et al., 2015). Deshalb ist eine Frühdiagnose essenziell, um spätere Komplikationen und Folgen des Bluthochdrucks zu vermeiden (Bogdanovic et al., 2012).

Betroffenen werden eine salzarme Diät und kaliumsparende Diuretika wie Triamteren oder Amilorid verschrieben (Garty und Palmer, 1997; Hanukoglu und Hanukoglu, 2016).

1.4.2 Pseudohypoaldosteronismus Typ 1:

Der Pseudohypoaldosteronismus Typ 1 ist eine seltene Erkrankung, die in Typ 1A und Typ 1B kategorisiert wird. Sie unterscheiden sich in der Entstehung, Vererbung und Schweregrad der Salzausschüttung (Hanukoglu 1991). Die ersten Berichte über die Erkrankung stammen aus dem Royal's Children Hospital in Melbourne, Australien aus dem Jahre 1958 (Cheek und Perry, 1958).

Der erste Typ (1A) wird autosomal-dominant vererbt und gilt als die mildere, renale Form. Mutationen im NR3C2 Gen, das für den Mineralcorticoid-Rezeptor kodiert, führt dazu, dass Aldosteron nicht binden kann (Riepe et al. 2006). Die Krankheit lässt sich durch hohe Natriumausscheidung im Urin, Hypovolämie, Hyperkaliämie, metabolische Azidose, hohe Renin-und Aldosteronspiegel charakterisieren. Die betroffenen Neugeborenen werden mit einer Natriumchlorid-Gabe behandelt, die zur Verbesserung der Symptome führt (Zennaro et al., 1995).

Der PHA Typ 1B ist eine autosomal-rezessive Form der Erkrankung, die den ganzen Körper betrifft (Hanukoglu,1991). Die Ursache dafür sind Mutationen in den SCNN1B und SCNN1G - Genen auf dem 16p-Chromosom und SCNN1A – Gen auf dem 12p-Chromosom (Strautnieks et al.,1996), die für die α , β , γ - Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals (ENaC) kodieren und deshalb zum Funktionsverlust des Kanals führen (Chang et al.,1996). Individuen, die nur auf einem Allel die Mutation besitzen, haben keine Beschwerden (Riepe et al.,2009).

Patienten leiden unter Hyponatriämie, Hyperkaliämie, Azidose, Hypotonie und Dehydratation, die vor allem bei Säuglingen und Kindern lebensgefährlich sein können (Edelheit et al.,2005; Hanukoglu,1991). Es kommt unter anderem zu hohem Salzverlust aus den Nieren, Schweißdrüsen, Speicheldrüsen und Lunge (Hanukoglu,1991). Betroffene klagen öfters über Pfeifatmung, chronischem Schnupfen, Lungenödeme und Infektionen der Atemwege. Die respiratorischen Leiden sind darauf zurückzuführen, dass die Flüssigkeitsabsorption auf der Oberfläche der Atemwege gestört ist und dadurch es zu einer übermäßigen Flüssigkeitsansammlung kommt. Eine Mutation in der α – Untereinheit des epithelialen Natriumkanals wird als die genetische Ursache für die Atemwegsbeschwerden gesehen (Hanukoglu et al.,1994; Kerem et al.,1999; Schaedel et al.,1999).

Die Therapie von PHA Typ1B erfolgt mit einer lebenslänglichen, täglichen Gabe von Natriumchlorid und Flüssigkeitszufuhr (Hanukoglu und Hanukoglu,2010; Hogg et al.,1991),wobei der Krankheitsgrad mit fortschreitendem Alter nachlässt (Adachi et al.,2010). Säuglinge und Frühgeborene leiden durch den gestörten Elektrolytspiegel und den respiratorischen Leiden stärker darunter (Martinerie et al.,2009; Kerem et al.,1999).

2.Materialien

In diesem Abschnitt sind die Materialien und Hilfsmittel aufgelistet, die beim praktischen Teil der wissenschaftlichen Arbeit verwendet wurden.

Sie wurden von folgenden Firmen bestellt: Sigma Aldrich® , BioRad®, AGFA®, gibco® - Thermo Fisher®.

Trenngel (Running Gel, 12,5%): 4,2mL 30% Acrylamid (+1% Bisacrylamid)
3,3mL dH₂O
2,5mL Lower Tris
5,0µL TEMED (BioRad®)
50µL 10% APS

Sammelgel (Stacking Gel, 4,0%): 1,3mL 30% Acrylamid
6,1mL dH₂O
2,5mL Upper Tris
100µL 10% SDS
10µL TEMED (BioRad®)
50µL 10% APS

Upper Tris (pH=6,8 mit 37% conc.HCl):	Tris-Base	60,5g
	SDS	4,0g
	dH ₂ O	ad 1000mL

Lower Tris (pH=8,8 mit 37% conc.HCl):	Tris-Base	187,0g
	SDS	4,0g
	dH ₂ O	ad 1000mL

RPMI-Medium: 500mL RPMI 16/40 (Sigma Aldrich®)
+10% (50mL) FBS (Sigma Aldrich®)
+1% (5mL) Glutamin
+1% (5mL) P/S (Penicillin-Streptomycin)

sekundärer Antikörper(0,5%): 0,25g BSA
50,0mL TBST
1µL (anti-mouse/anti-rabbit)

3% Blocking Solution: 1,5g BSA
50mL TBST
100µL NaN₃ (0.02%)

1M Tris-Cl (pH=7,5): 121,1g Tris-Base (Sigma Aldrich®) in 800mL dH₂O
+ 37% conc. HCl (~65ml) bis pH=7,5

10x TBS:	NaCl	87,7g
	1M Tris-Cl (pH=7,5)	100mL
	dH ₂ O	ad 1000mL

1x TBS: 100mL 10x TBS ad 1000mL dH₂O

1x TBST: 100ml 10x TBS ad 1000ml dH₂O
+1mL Tween® 80 (Sigma Aldrich®)

10% SDS: 1,0g SDS in 10mL dH₂O

10% APS: 100mg APS in 1mL dH₂O

10% NaN₃: 100mg Natriumazid in 1mL dH₂O

10x Running Buffer:	Tris-Base	60,0g
	Glycin	288,0g
	SDS	20,0g
	dH ₂ O	ad 2000mL

1x Running Buffer: 100mL 10x Running Buffer ad 1000mL dH₂O

Towbin Buffer:	Tris-Base	3,0g
	Glycin	14,1g
	SDS	1,0g
	Methanol	200mL
	dH ₂ O	800mL

0.2M Natriumacetat (pH=5,0):	Natriumacetat – Trihydrat	1,4g
	Eisessig	0,3mL
	dH ₂ O	ad 50mL
	(+10N NaOH bis pH=5,0)	

4x Sample Buffer:	Glycerin	4,0mL
	Upper Tris	4,8mL
	SDS	0,8g
	Bromphenolblau	4,0mg
	Beta-Mercaptoethanol(unter Abzug!)	0,5mL
	dH ₂ O	0,7mL

Developer(**Lichtschutz!**): 25,0mL DEV(AGFA®) + 125mL dH₂O

Fixierer(**Lichtschutz!**): 30,0mL FIX(AGFA®) + 150mL dH₂O

3.Methoden:

3.1 Zellkultur:

Während der gesamten Diplomarbeit wurde mit A549-Zellen gearbeitet. A549-Zellen sind humane, epitheliale Adenokarzinomzellen der Lunge, die vermehrt ENaC exprimieren und ideal für die Experimente waren.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen (Passage 36) in RPMI 16/40 – Nährmedium (+10% FBS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) in eine T25-Kulturflasche eingelegt und in einem Inkubator (37°C , 5% CO₂) aufbewahrt.

Vier Tage später wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop analysiert und eine Konfluenz von mindestens 80% festgestellt. Deshalb konnte man schon splitten und die Zellen in eine neue Flaschen aufteilen. Das alte Medium wurde unter sterilen Bedingungen (Laminar Air Flow) aus der Flasche mithilfe des Vakuums abgesaugt. 1,5mL PBS (phosphate buffered saline) wurde hinzugefügt und einige Male über den Boden geschwenkt. Dieser Vorgang dient zur Reinigung der gewachsenen Zellen. Danach wurde PBS abgesaugt, 0,5mL Trypsin/EDTA direkt auf die Zellen getropft, am Boden verteilt und 5 Minuten im Inkubator einwirken lassen. Nach fünf Minuten wurde unter dem Lichtmikroskop festgestellt, dass sich die Zellen vom Boden abgelöst haben. Unter Laminar Air Flow wurde der Flasche 4,5mL RPMI-Medium hinzupipettiert und mit dem Pipetboy resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde 1mL in eine neue T25 Kulturflasche (=25cm², Backup), die mit 4.0mL RPMI-Medium vorgelegt war, hinzugefügt. Die restliche Suspension wurde abgesaugt und entsorgt. Die neue Flasche wurde in den Inkubator gestellt, bis die Zellen wieder mindestens 80% konfluent waren. Danach wurden dieselben Schritte wiederholt.

Vor der Wirkstoffbehandlung wurden mehrere Backups gemacht, um viele Zellen für die Petrischalen wachsen zu lassen. In jede Petrischale wurde 1mL Zellsuspension + 9mL RPMI-Medium vorgelegt und im Inkubator aufbewahrt. Nach 48h waren alle Schalen konfluent und für die Wirkstoffbehandlung bereit.

3.2 Wirkstoffbehandlung:

Die Zellen wurden mit dem Wirkstoff AP318 (**200nM** Konzentration) behandelt. Die Konzentration wurde bewusst so ausgewählt, weil in Vorversuchen zur Konzentrations-Wirkungs-Beziehung bei dieser Konzentration eine maximale Wirkung erzielt wurde. Aus einer 1mM(=1000µM) Stammlösung wurde eine 1:5 Verdünnung (200µM) hergestellt. Pro Petrischale wurde 5µL aus der 200µM Lösung in 5mL Medium gemischt, auf die Zellen getropft und inkubiert. Eine Platte diente als Kontrolle und wurde nicht mit AP318 behandelt.

Je nach Einwirkzeit (30min,60min,120min) wurden die drei Schalen aus dem Inkubator geholt und für die Zelllysate-Herstellung vorbereitet.

Zelllysate:

Nach den jeweiligen Einwirkzeiten wurde das Medium mit dem Wirkstoff aus den Petrischalen entfernt und mit 10mL kaltem PBS kurz gespült. Die Pufferlösung wurde abgesaugt. Der nächste Schritt umfasste die Loslösung der Zellen vom Plattenboden, der mithilfe von 700µL Natriumacetat (0,2M, pH=5) möglich war. Die kalte Lösung wurde auf die Zellen getropft und gut verteilt. Danach wurden die Zellen zusammen geschabt und in ein Eppendorf-Tube pipettiert.

Mithilfe einer Ultraschallsonde mussten die Zellen in den Gefäßen sonifiziert werden, um die Zellmembrane zu zerreißen. Bei diesem Schritt wurden drei Wiederholungen durchgeführt. Jedes Eppendorf-Gefäß wurde 10 Sekunden lang sonifiziert und zwischendurch 30 Sekunden auf Eis gestellt. Nach Beendigung des Vorgangs kam in jede Probe 7µL Triton X-100 (10%) hinein. Alle Gefäße wurden gevortext und 30 Minuten auf Eis gelassen. Anschließend mussten sie bei 4°C fünfzehn Minuten lang bei 13500U/min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Tubes pipettiert und die Zellpellets am Boden entsorgt.

Die neuen Gefäße mit dem Zelllysate wurden bei -20°C gelagert und waren für den nächsten Schritt bereit.

Bradford Protein Assay:

Der Bradford-Test diente zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten. Beim Western Blot müssen vergleichbare Proteinmengen auf die Gele aufgetragen werden, um die ausgewerteten Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

Dafür wurde eine 96-Loch-Mikrotiterplatte verwendet. In den ersten 3 Reihen wurden die Standards je 5µL aufgetragen. Rechts davon wurde aus jedem Probengefäß 5µL dreifach aufgetragen (siehe Abbildung 8). Anschließend kam in jedes Loch 250µL Bradford-Reagenz hinzu.

Standard 0mg/ml	Standard 0mg/ml	Standard 0mg/ml	Control	Control	Control
Standard 0.25mg/ml	Standard 0.25mg/ml	Standard 0.25mg/ml	30min	30min	30min
Standard 0.50mg/ml	Standard 0.50mg/ml	Standard 0.50mg/ml	60min	60min	60min
Standard 0.75mg/ml	Standard 0.75mg/ml	Standard 0.75mg/ml	120min	120min	120min
Standard 1.00mg/ml	Standard 1.00mg/ml	Standard 1.00mg/ml			
Standard 1.50mg/ml	Standard 1.50mg/ml	Standard 1.50mg/ml			
Standard 1.75mg/ml	Standard 1.75mg/ml	Standard 1.75mg/ml			
Standard 2.00mg/ml	Standard 2.00mg/ml	Standard 2.00mg/ml			

Abb.8: Schematische Darstellung der verwendeten 96 Mikrotiterplatte

Nach der Messung der Absorption bei 595nm wurde die Standardkurve mit dem Computer bestimmt und die Proteinkonzentrationen ermittelt.

Je nach Konzentration wurde eine bestimmte Probenmenge mit 10µL Sample Buffer und destilliertem Wasser verdünnt, um 40µL in Summe zu erreichen. Die niedrigste

Konzentration (30 μ L) wurde nur mit Sample Buffer (10 μ L) verdünnt. Nach dem Vortexen konnten die blau gefärbten Eppendorf-Gefäße für das Auftragen auf die Gele vorbereitet werden.

3.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine semiquantitative Methode, die zum Nachweis von Proteinen dient. Dabei werden sie auf eine Trägermembran übertragen und visualisiert.

Vorbereitung der Proben:

Die Proben mussten gut gemischt sein. Danach kamen sie bei 95°C für fünf Minuten in den Heizblock hinein. Dieser Schritt war notwendig, um die Entfaltung der Proteine zu erzielen. Nachdem alle Tubes mindestens fünf Minuten auf Eis gestellt waren, wurden sie 30 Sekunden kurz zentrifugiert. Anschließend waren die Proteine in den Eppendorf-Gefäßen bereit, aufgetragen zu werden.

SDS-PAGE:

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglichte eine Analyse und Trennung von Proteinen.

Es wurde mit der Herstellung des Trenngels (12,5%) begonnen. Das Trenngel hat die Aufgabe die Proteine nach ihrer Masse aufzutrennen. Destilliertes Wasser, Acrylamid (30%) und TRIS (pH=8,8) wurden zuerst in einem Tube zusammengemischt. Erst danach kamen TEMED und APS(10%) hinzu, die zur Polymerisation führten.

Die Mischung wurde zwischen zwei eingespannten Glasplatten, die vorher aufgebaut waren, gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um Luftblasen zu vermeiden. Das Trenngel musste danach eine Stunde lang auspolymerisieren. Nach einer Stunde wurde Isopropanol entfernt, das Gel mit destilliertem Wasser nachgewaschen und mit Filterpapier abgetrocknet.

Im nächsten Schritt konnte das Sammelgel (4%) hergestellt werden. Im Gegensatz zum Trenngel beinhaltet das Sammelgel alle aufgetragenen Proteine in der jeweiligen Tasche, bevor sie im unteren Gel (Trenngel) aufgetrennt werden. Destilliertes Wasser, Acrylamid (30%), TRIS (pH=6,8) und SDS (10%) wurden zusammengefügt. Für die Polymerisation kam noch TEMED und APS(10%) hinzu. Nach erneutem Vortexen wurde das Sammelgel auf das Trenngel bis zum Überlaufen gegossen. Der Probenkamm wurde luftblasenfrei ins Gel gesteckt und 60 Minuten polymerisiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Probenkamm entfernt und die Taschen mit destilliertem Wasser gespült.

Nach dem Polymerisationsschritt wurde die Elektrophoresekammer aufgebaut. Sie bestand aus einem Tank, der Platz für vier Gele hatte und bis zur Markierung mit dem Running Buffer (1x) befüllt wurde.

Schließlich wurden in die Taschen die Proben vorsichtig aufgetragen. In die linke Tasche wurde 5µL vom Marker vorsichtig pipettiert, der zur Orientierung und Einschätzung der Größenzuordnung in kDa (kilo Dalton) half. In die restlichen Taschen kamen 30µL der Proben hinzu. In die rechte Tasche wurde erneut 5µL vom Marker aufgetragen (siehe Abbildung 9 und 10).

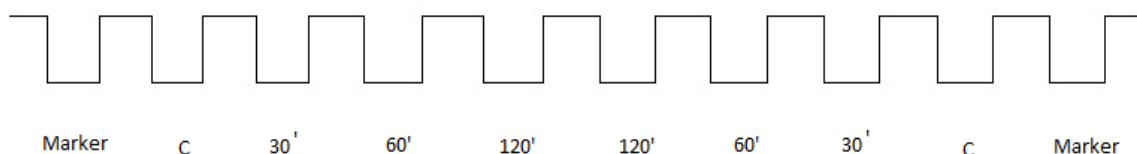


Abbildung 9: schematische Darstellung der Probentaschen auf mehreren Gele

Nach dem Auftragen wurde die Kammer mit dem Deckel verschlossen und die Auftrennung für ungefähr 60 Minuten bei 200V begonnen.

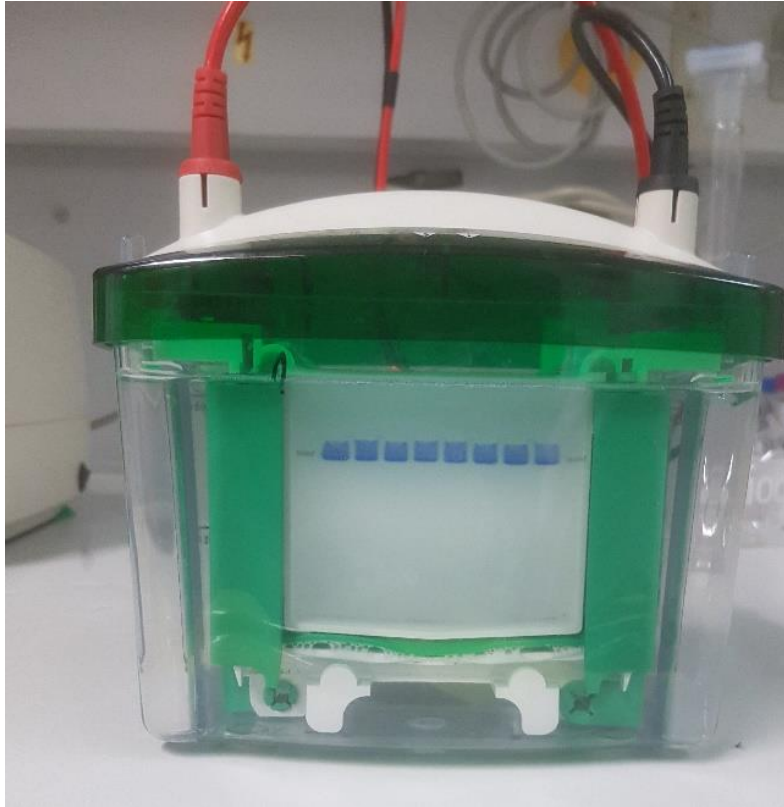


Abbildung 10: Elektrophoresekammer während der Auftrennung

Semidry-Blotting:

Nach Abschluss der Gelelektrophorese diente das Blotverfahren zur Übertragung der aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Trägermembran aus Nitrozellulose. Dafür mussten zurechtgeschnittene Filterpapiere und Nitrozellulosemembran im Towbin-Buffer befeuchtet werden. Nebenbei wurden die Gele aus den Glasplatten entnommen, wobei das Sammelgel mit einem Spatel entsorgt wurde. Die Proteine befanden sich auf dem Trenngel.

In die Blottingkassette kam zuerst das Filterpapier hinein. Anschließend wurde die Membran daraufgelegt und mit dem Gel überschichtet. Ganz oben kam das zweite Filterpapier hinzu. Mithilfe eines Handrollers wurde luftblasenfrei gerollt, die Kassette

fest verschlossen und das Gerät gestartet. Nach 30 Minuten (25V, 1mA) war der Transfer abgeschlossen.

Die erhaltene Membran wurde mit einer Blocking Solution (3% BSA+0,02% NaN₃) über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gelassen. Durch diesen Vorgang wurden freie, unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert, die die Resultate stören würden.

Immunodetektion:

Dieser Schritt war notwendig, um die gesuchten Proteine auf der Membran spezifisch zu identifizieren. Nach dem Semidry-Blotting wurde die Membran über Nacht blockiert und einmal mit TBST (1x, Tris-buffered saline with Tween) fünf Minuten gewaschen. Danach wurde der primäre Antikörper hinzugefügt und bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Die eingesetzten primären Antikörper dienten zur spezifischen Bindung an die gesuchten Proteinbanden und konnten mehrmals eingesetzt werden.

Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal mit TBST(1x) fünf Minuten gewaschen und mit dem neu hergestellten, sekundären Antikörper 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper (anti-mouse / anti-rabbit) wurde spezifisch an den primären Antikörper gebunden, der später zum nachweisbaren Signal führte.

Primäre Antikörper:

- 1) SGK p-Serin 422 (1:1000)
- 2) SGK p-Serin 78 (1:1000)
- 3) SGK (C-term.) (1:1000)
- 4) SGK (N-term.) (1:1000)
- 5) Anti phospho – SGK 1 (1:1000)

Detektion:

Die Detektion erfolgte mit dem Chemolumineszenz-Prozess in der Dunkelkammer. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper musste die Membran jeweils fünf Minuten dreimal mit TBST (1x) und einmal mit TBS (1x) gewaschen werden. Während des letzten Waschprozesses wurde die Luminol-Lösung (1mL) hergestellt und anschließend über die Membran verteilt.

Es war wichtig, dass die Luminol-Lösung die Oberfläche drei Minuten komplett benetzte. Im Anschluss daran kam die Membran luftblasenfrei in einer Klarsichtfolie in die Hyperkassette.

In der Dunkelkammer wurde auf die Membran ein zurechtgeschnittener Röntgenfilm gelegt und sechs bis fünfzehn Minuten stehen gelassen. Die Zeit wurde experimentell bestimmt. Währenddessen wurden drei Behälter mit dem Entwickler, Wasser und Fixierer vorbereitet.

Nach Ablauf der Zeit wurde der Film im Entwickler 1-2 Minuten geschwenkt und danach im Wasser 30 Sekunden gewaschen. Anschließend wurde der Röntgenfilm im Fixierer 45-60 Sekunden geschwenkt (siehe Abbildung 11), unter fließendem Wasser vom Fixierer befreit und letztlich luftgetrocknet.

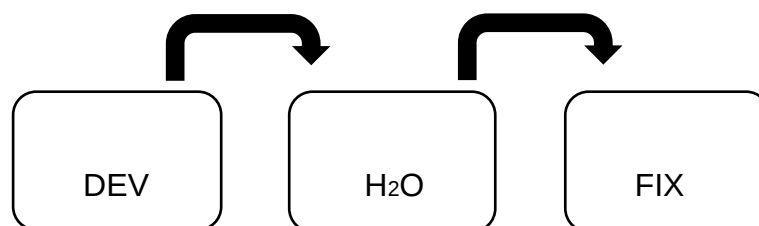


Abbildung 11: Ablauf der Entwicklung in der Dunkelkammer

Auswertung:

Bevor es zur Auswertung kam, wurde mit allen relevanten Membranen die Loading Control durchgeführt, um zu sehen, ob überall die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde. Demzufolge konnten die Ergebnisse miteinander verglichen und ausgewertet werden.

Prim. Antikörper für Loading Control: 1) ms-alpha-beta Tubulin 1:2000

2) ms-alpha Tubulin 1:2000

Die Proteinbanden auf den Filmen wurden eingescannt und mit dem Programm „Image J“ analysiert. Das Programm konnte je nach Intensität der Banden Flächen reproduzieren und diese als Zahl angeben. Dabei war es wichtig die Flächen den richtigen Banden zuzuordnen und zu markieren.

Die erhaltenen Daten wurden ins nächste Programm „Origin“ kopiert und schließlich ausgewertet. Die einzelnen Ergebnisse wurden als Diagramme ersichtlich dargestellt. Zum Schluss konnte die Signifikanz mithilfe der „GraphPad“-Software herausgefunden werden.

4. Ergebnisse

Die Signifikanz wurde für die Ergebnisse folgendermaßen festgelegt:

- $p < 0.05$ * **signifikant**
- $p < 0.01$ ** **sehr signifikant**
- $p < 0.001$ *** **extrem signifikant**

1) SGK p-Serin 422

Die Inkubation mit dem primären Antikörper SGK p-Serin 422 liefert einen Hinweis auf die erhöhte Expression des SGK1-Signalwegs. Die A549-Zellen wurden mit AP318 30 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten behandelt. Die Zellen, die mit dem Wirkstoff nicht behandelt worden sind, wurden zur Kontrolle herangezogen.

Nach 30 Minuten zeigt die Bande im Vergleich zur Kontrolle ein extrem signifikantes Ergebnis. Nach 60 und 120 Minuten ist auch eine extreme Signifikanz ersichtlich.

Nach 60 Minuten scheint sich die Aktivität nicht deutlich zu ändern

Die alpha-beta Tubulin-Banden zeigen die aufgetragenen Proteinkonzentrationen und dienen als Loading Kontrolle (siehe Abbildung 12 und 13).

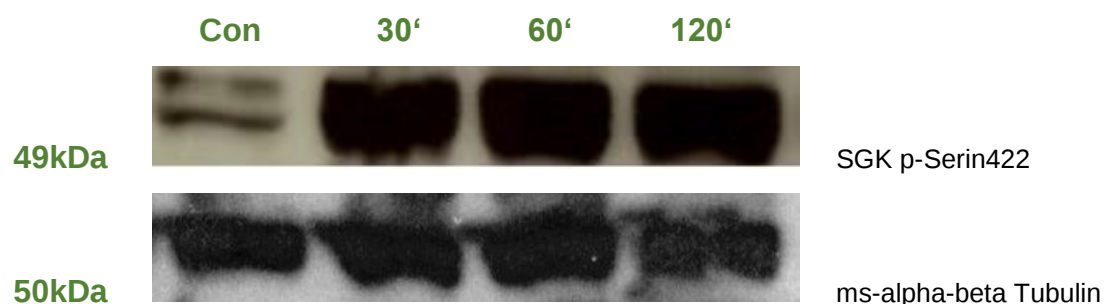


Abb.[12] Western-Blot von SGK p-Serin 422

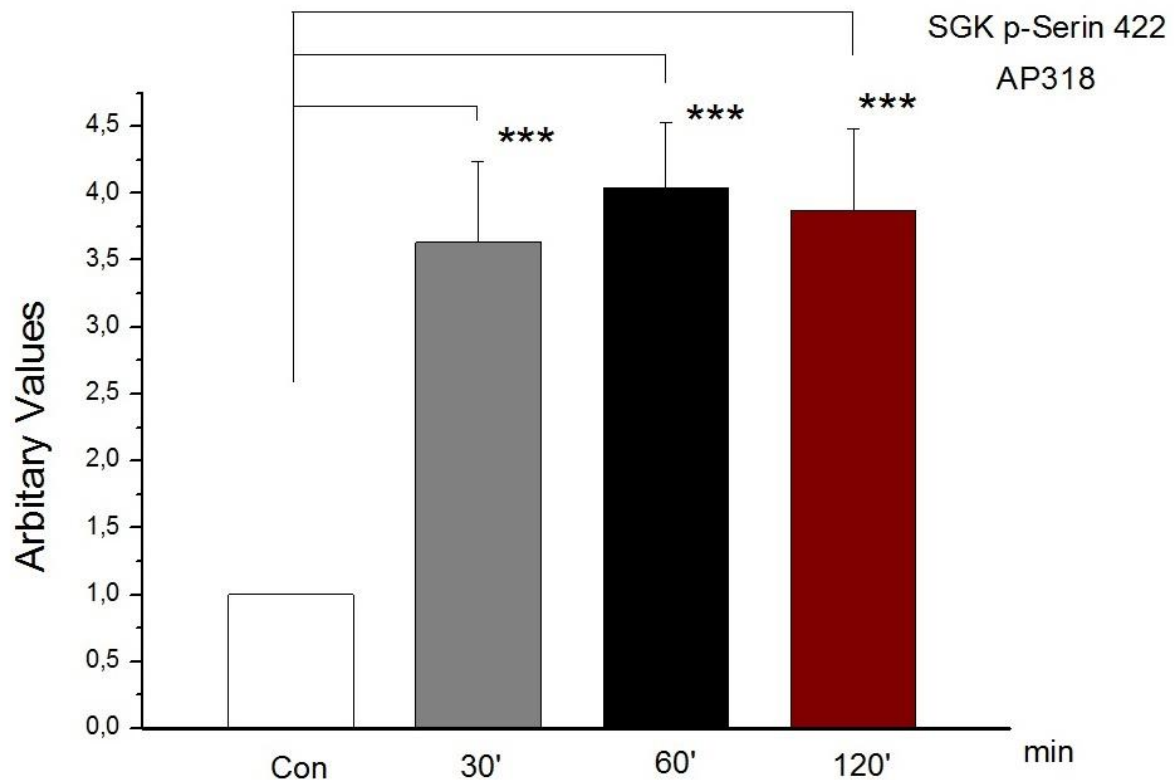


Abb.[13] Die Grafik veranschaulicht die erhöhte SGK1-Aktivität nach 30,60 und 120 Minuten Behandlung mit AP318. Dabei werden die einzelnen Ergebnisse mit der Kontrolle(unbehandelt) verglichen und zeigen einen extrem signifikanten Unterschied.

2) SGK p-Serin 78

Der primäre Antikörper SGK p-Serin 78 zeigt eine erhöhte Aktivität des SGK1-Signalwegs. Die Lungenkarzinomzellen wurden mit dem Wirkstoff 30, 60 und 120 Minuten behandelt. Die unbehandelten Zellen wurden als Kontrolle zum Vergleich genommen. Nach 30 Minuten zeigt das Ergebnis einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

Nach 60 und 120 Minuten Wirkstoffbehandlung ist eine signifikante Erhöhung des Signals zu sehen. Die Wirkung scheint sich nach 60 Minuten einigermaßen gleich stark zu halten. Die alpha-beta Tubulin-Banden zeigen die Proteinkonzentrationen, die auf das Gel gleichmäßig aufgetragen worden sind (siehe Abbildung 14 und 15).

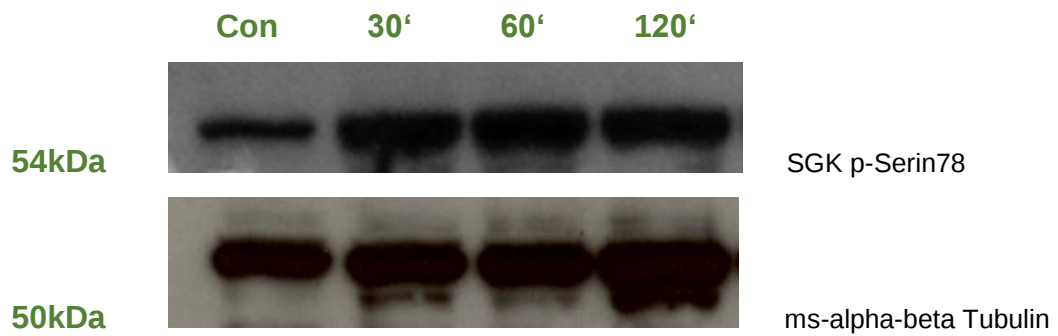


Abb.[14] Western-Blot von SGK p-Serin 78

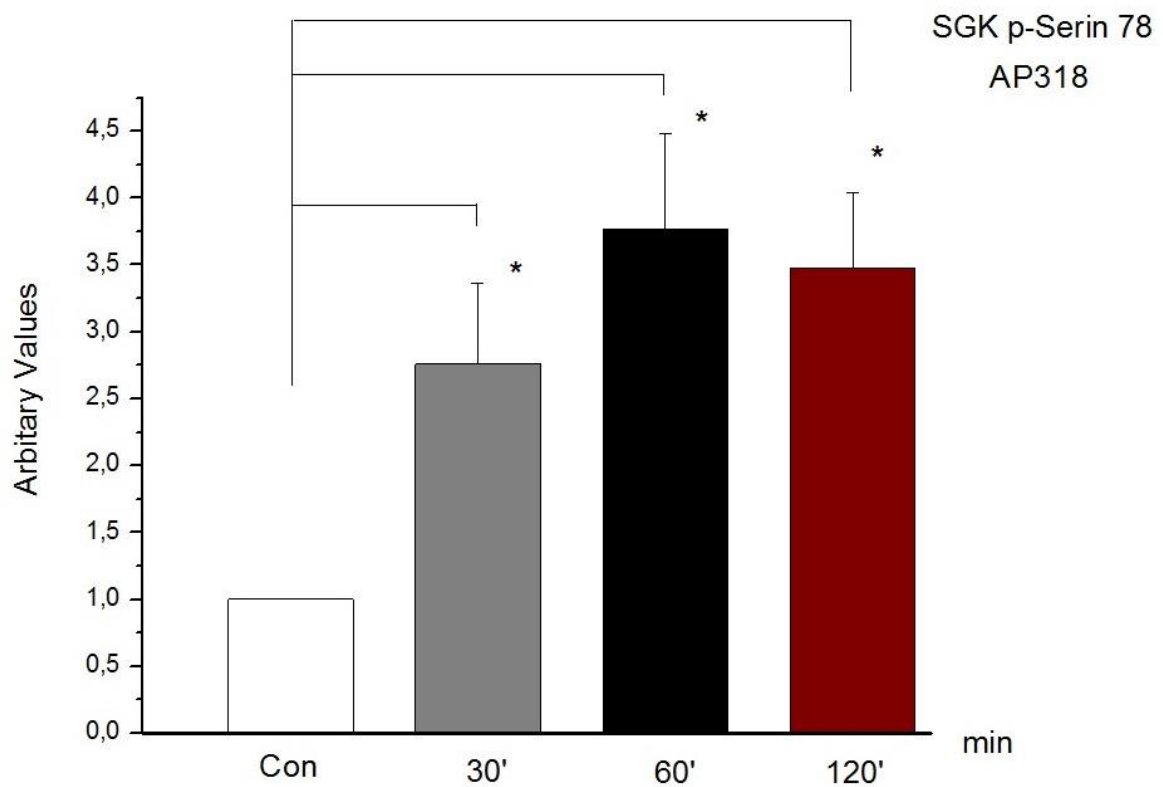


Abb.[15] Die Grafik veranschaulicht die erhöhte SGK1-Aktivität nach 30,60 und 120 Minuten Behandlung mit AP318. Dabei werden die einzelnen Ergebnisse mit der Kontrolle(unbehandelt) verglichen und zeigen einen signifikanten Unterschied.

3) SGK (C-Term.)

Der dritte Antikörper SGK (C-Term.) liefert ein eindeutiges Ergebnis über den SGK1-Signalweg. Die Proben wurden mit AP318 30 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten inkubiert. Eine unbehandelte Platte mit Zellen wurde als Kontrolle mitbewertet.

Das Ergebnis zeigt nach 30 Minuten Behandlungszeit einen extrem signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Nach 60 und 120 Minuten ist auch eine extrem signifikante Erhöhung der Intensität zu beobachten. Dennoch scheint sich die Expression nach 60 Minuten ungefähr konstant zu halten.

Die alpha Tubulin-Banden zeigen die Proteinmengen, die in die Geltaschen gleichermaßen hinzupipettiert worden sind (siehe Abbildung 16 und 17).

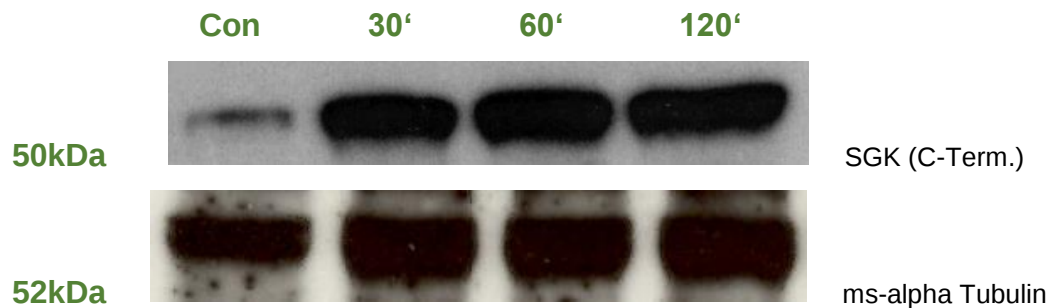


Abb.[16] Western-Blot von SGK (C-Term.)

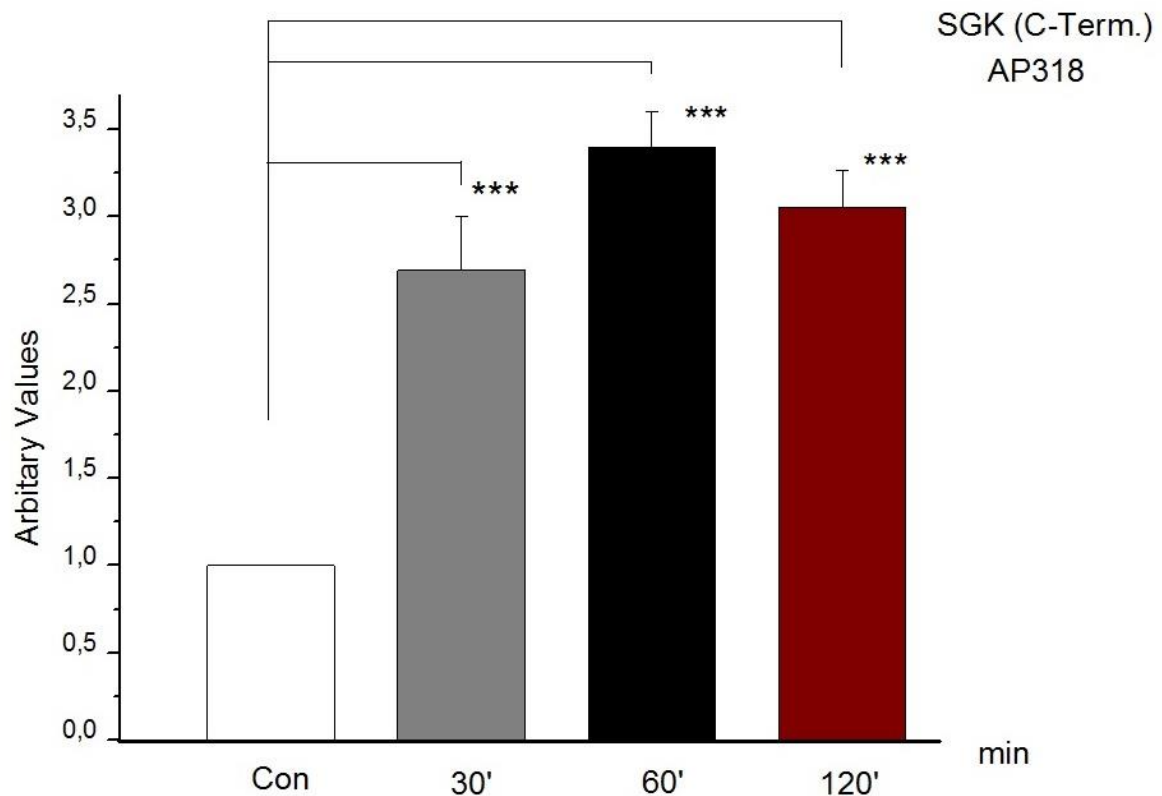


Abb.[17] Die Grafik veranschaulicht die erhöhte SGK1-Aktivität nach 30,60 und 120 Minuten Behandlung mit AP318. Dabei werden die einzelnen Ergebnisse mit der Kontrolle(unbehandelt) verglichen und zeigen einen extrem signifikanten Unterschied.

4) SGK (N-Term.)

Nach der Inkubation mit dem Antikörper SGK (N-Term.) wurden die entsprechenden Banden entwickelt. Sie lassen eine erhöhte Aktivität des SGK1-Signalweges dokumentieren. Die Behandlungszeit der Zellen betrug 30,60 und 120 Minuten. Die erste Bande stellt die Zellen ohne Wirkstoffbehandlung dar.

Nach 30 Minuten zeigt die Bande im Vergleich zur Kontrolle ein signifikantes Ergebnis. Nach 60 und 120 Minuten zeigen die Signale im Verhältnis zur Kontrolle eine extreme Signifikanz, wobei die Aktivität sich nach 60 Minuten nicht allzu sehr ändert und konstant bleibt. Die alpha-Tubulin-Banden beweisen die Proteinmengen auf der entwickelten Membran (siehe Abbildung 18 und 19).

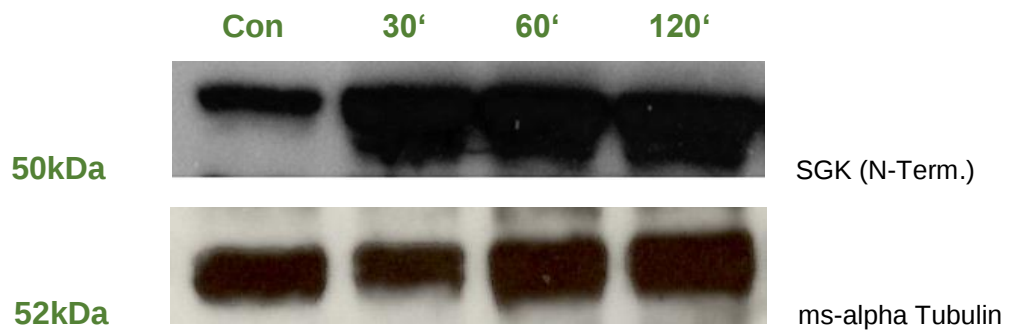


Abb.[18] Western-Blot von SGK (N-Term.)

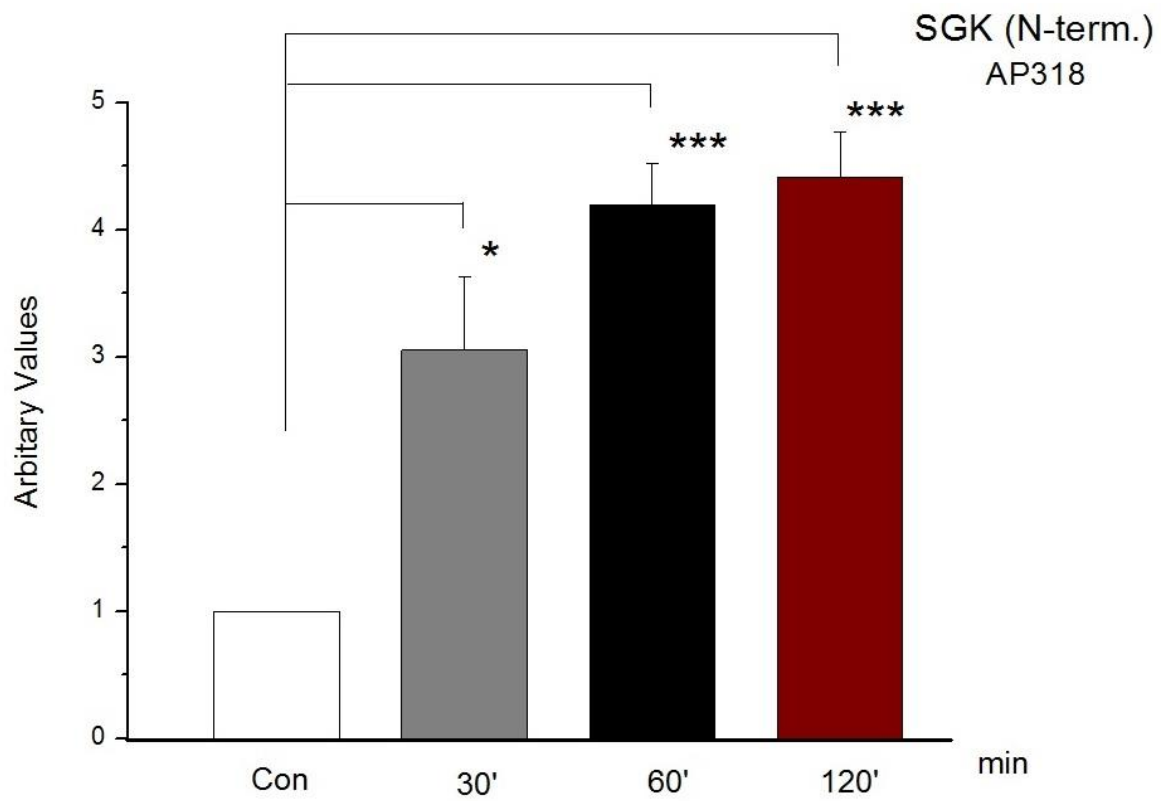


Abb.[19] Die Grafik veranschaulicht die erhöhte SGK1-Aktivität nach 30,60 und 120 Minuten Behandlung mit AP318. Dabei werden die einzelnen Ergebnisse mit der Kontrolle(unbehandelt) verglichen und zeigen signifikante bzw. extrem signifikante Unterschiede.

5) Anti phospo SGK 1

Der primäre Antikörper Anti p-SGK1 visualisiert eine steigende Expression des SGK1-Signalweges. Die A549-Zellen wurden mit AP318 behandelt. Die Behandlungszeit betrug 30,60 und 120 Minuten. Zur Kontrolle wurde eine Platte nicht behandelt und bei der Auswertung berücksichtigt.

Nach 30 Minuten zeigt die Bande im Vergleich zur Kontrolle ein extrem signifikantes Signal. Nach 60 und 120 Minuten ist auch eine extreme Signifikanz ersichtlich. Allerdings bleibt das Signal nach 60 Minuten beständig und ändert sich gering. Die alpha Tubulin-Banden stellen die gleichmäßig aufgetragene Proteinmenge dar (siehe Abbildung 20 und 21).

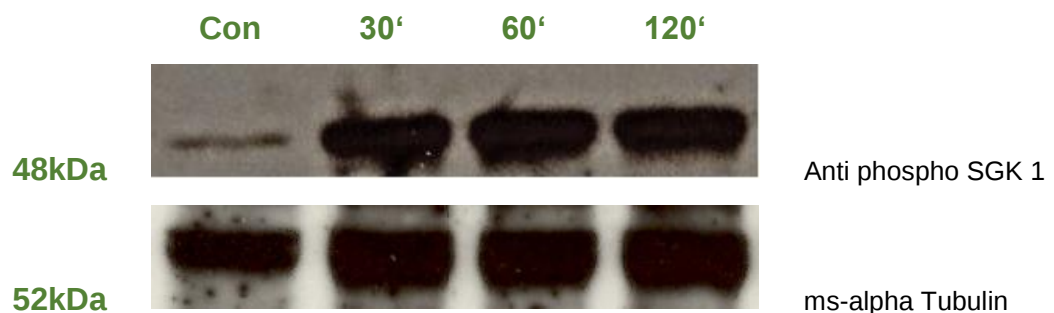


Abb.[20] Western-Blot von Anti phospho SGK1

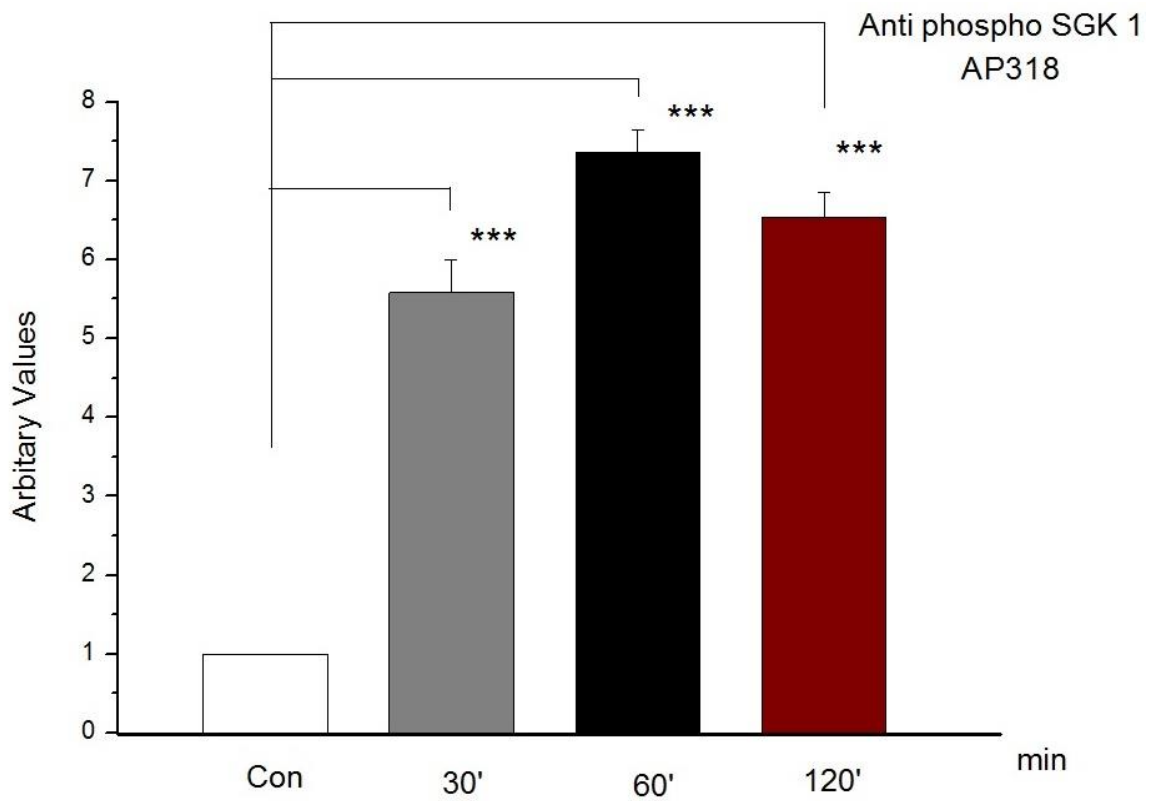


Abb.[21] Die Grafik veranschaulicht die erhöhte SGK1-Aktivität nach 30,60 und 120 Minuten Behandlung mit AP318. Dabei werden die einzelnen Ergebnisse mit der Kontrolle(unbehandelt) verglichen und zeigen einen extrem signifikanten Unterschied.

Diskussion:

Nach der Detektion ermöglichte die Auswertung der Filme aussagekräftige Ergebnisse über SGK1 und TIP-Peptid AP318. In den Untersuchungen dieser Diplomarbeit wurde der Wildtyp-ENaC aus dem Zelllysate der Lungenkarzinomzellen getestet. Das TIP-Peptid AP318 wurde auf die Zellen getropft und für 30, 60 und 120 Minuten inkubiert. Alle fünf spezifischen, primären SGK1-Antikörper zeigten eine erhöhte Aktivität des SGK1-Signalweges, wobei nach 60 Minuten das Signal etwa konstant blieb.

Es scheint so, dass AP318 den SGK1-Signalweg aktiviert. Dies führt dazu, dass ENaC durch Nedd4-2 nicht ubiquitiniert wird und folglich nicht internalisiert und durch Lysosome abgebaut werden kann. Demzufolge steigt die ENaC-Expression und möglicherweise die Öffnungswahrscheinlichkeit. Die erhöhte Expression wird unter anderem auch durch Verlagerung von zusätzlichen Ionenkanälen zur Apikalmembran erreicht (Butterworth et al., 2009).

Bei der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals spielt die Kinetik des Ionenkanals eine Rolle. Die erhöhte Expression der Kanäle in der Membran bedeutet nicht, dass die Aktivität der Ionenkanäle auch steigt. Die Kinetik kann unverändert bleiben, aber durch vermehrte Expression der Kanäle in der Zellmembran kann der Strom erhöht sein. In Single channel patch-clamp Experimenten konnte eine signifikante Zunahme der Öffnungswahrscheinlichkeit beobachtet werden (Hazemi et al., 2010). In whole-cell Patch clamp Experimenten wurde mehr Strom registriert (Hazemi et al., 2010). AP318 hat vermutlich eine stärkere Wirkung auf die Kinetik der Kanäle als AP301. Dieses Erkenntnis könnte bei Erkrankungen, die durch Dysfunktion des epithelialen Natriumkanals ausbrechen, als Therapieansatz genommen werden.

Es ist zu erwähnen, dass das Liddle-Syndrom und Pseudohypoaldosteronismus Typ 1B bisher nur symptomatisch behandelt werden und in sehr jungen Jahren lebensbedrohlich sein können. Beim Liddle-Syndrom kommt es zu einer gain-of-function des Kanals, die durch Mutationen in den Untereinheiten ausgelöst wird. Bisher kann die Erkrankung nur mit kaliumsparenden Diuretika wie Amilorid oder

Triamteren behandelt werden, die die Natriumkanäle im spät-distalen Sammelrohr blockieren und nur zu einer Linderung der Symptome führen.

Beim PHA1B führen Mutationen in den Genen, die für die Untereinheiten des ENaC's kodieren, zu einer loss-of-function des Kanals. Die derzeitige Behandlungsstrategie besteht darin, den Patienten Natriumchlorid in sehr hohen Konzentrationen zu verabreichen sowie den Elektrolyt- und Wasserhaushalt auf Lebenszeit zu korrigieren.

TIP-Peptide binden am Carboxy-Terminus der α - Untereinheit des ENaC's und erhöhen die Funktion des Kanals (Willam et al.,2017). Das TIP-Peptid AP301 bindet an den epithelialen Kanal reversibel und scheint eine kürzere Wirkzeit zu haben (Shabbir et al.,2013). Im Allgemeinen kann AP301 inhalativ angewendet werden und führen zu einer Verbesserung des Zustandes bei Patienten mit akuten Lungenverletzungen. Bisher wurde AP318 an Menschen noch nicht getestet.

Aus den Ergebnissen geht eindeutig hervor, dass die SGK1-Aktivität mit der Behandlungszeit tendenziell steigt. Es wurden fünf verschiedene SGK1-Antikörper eingesetzt, die die jeweilige phosphorylierte Position von SGK1 und die signifikante Erhöhung der Expression des Signalweges bestätigt haben. Bemerkenswert war die Erkenntnis, dass bei allen primären Antikörpern die SGK1-Aktivität nach 60 Minuten konstant blieb und nach 120 Minuten das Signal noch etwa gleich stark zu sehen war. Nach derzeitigem Erkenntnisstand scheint das TIP-Peptid AP301 transient zu sein und kaum relevante systemische Nebenwirkungen zu verursachen (Schwameis et al., 2014). Im Vergleich mit der AP301-Wirkung scheint das AP318 nicht transient zu sein. Es wäre in Zukunft von großer Bedeutung zu wissen, ob sich die Aktivität des Signalweges nach 120 Minuten noch hält oder abnimmt. Diese neue Erkenntnis könnte einen wichtigen Therapieansatz bei Lungenödemen und PHA1B bieten. Essenziell ist es zu bestätigen, ob das TIP-Peptid AP318 auch wenig relevante systemische Nebenwirkungen wie sein Vorgänger AP301 auslöst.

Die Experimente stützten sich auf SGK1, das ein Zwischenprotein in der großen Kaskade ist. Es ist von großer Wichtigkeit zu erforschen, welche Signalmoleküle vor und nach SGK1 eine wichtige Rolle in der ENaC-Expression einnehmen. Die genaue Verknüpfung von AP318 mit Nedd4-2 und PI3K ist noch nicht geklärt. Wichtig wäre

es aufzuklären, ob AP318 trotz einem PI3K-Inhibitor wie LY294002 einen Effekt auf ENaC aufweist.

Es könnte sein, dass AP318 die Bindungsstelle von Nedd4-2 am epithelialen Natriumkanal blockiert und sein Andocken verhindert. Durch weitere Entdeckungen in der großen Kaskade und in-vivo Experimenten könnte sich AP318 zu einem vielversprechenden Kandidaten zur inhalativen Behandlung von Lungenödemen und PHA1B in der Zukunft entwickeln.

Zusammenfassung:

Während der gesamten wissenschaftlichen Arbeit wurde die Wirkung von AP318 auf die Expression von ENaC über den SGK1-Signalweg analysiert. Zur Untersuchung wurde eine Lungenkarzinomzelllinie (A549) genommen, die den Wildtyp-ENaC hoch exprimiert hat. Nachdem die Zellen in den Petrischalen konfluent waren, wurde am selben Tag die Wirkstoffbehandlung durchgeführt. Drei Platten wurden mit AP318 für 30 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten inkubiert, wobei eine Platte unbehandelt blieb. Die wirkstofffreie Probe wurde als Kontrolle bei der Auswertung berücksichtigt. Anschließend wurden die Zelllysate gewonnen und die Proteinkonzentrationen in jedem Eppendorf-Gefäß mittels Bradford Protein Assay-Verfahren bestimmt. Je nach Berechnung der Proteinmengen wurden sie mit destilliertem Wasser und Sample Buffer verdünnt.

Während des Western Blot's wurden die Proben auf die 12.5% Gele aufgetragen und in der Elektrophorese-Kammer getrennt. Danach wurden die Proteine auf Membrane übertragen und mit BSA(3%) blockiert. Die Membrane wurden mit fünf spezifischen, primären Antikörpern und erforderlichen sekundären Antikörpern inkubiert und in der Dunkelkammer detektiert. Letztlich wurden die Filme am Computer ausgewertet und mit Diagrammen veranschaulicht.

Der ENaC ist ein nicht-spannungsabhängiger, epithelialer Natriumkanal, der aus vier Untereinheiten (α , β , γ , δ) aufgebaut ist und in verschiedenen Organen (Lunge, Haut, Niere, Colon, Auge, Schweiß-/Speicheldrüsen) des humanen Körpers vorkommt.

Seine Aufgabe besteht darin, für die Reabsorption der Natriumionen und des Wassers zu sorgen. Er ist essenziell für den Natriumhaushalt, Blutvolumen und Blutdruck.

In der Lunge steuern ENaC und die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ die alveoläre Flüssigkeitsclearance. Der intakte Kanal nimmt Natriumionen vom Lumen in die Epithelzellen auf und pumpt sie aus der Zelle ins Blut. Das Wasser wird passiv über die Aquaporine abtransportiert. Bei Dysfunktionen des Kanals während einer Lungenerkrankung kommt es zu Lungenödem.

Mutationen in den Untereinheiten und Genen führen zu einer loss-of-function (Pseudohypoaldosteronismus Typ 1B) und gain-of-function (Liddle-Syndrom). Diese Erkrankungen führen unter anderem zu Blutdruckveränderungen und Elektrolytschwankungen.

TIP-Peptide wie AP301 und AP318 wurden entwickelt, um die Lektin-ähnliche Domäne von $\text{TNF}(\alpha)$ zu imitieren und ENaC zu stimulieren. Sie binden an die α - Untereinheit des Kanals und verbessern schließlich die Lungenfunktion.

ENaC lässt sich durch AP318 und verschiedene Mechanismen wie PI3K-Signalweg und Aldosteron regulieren. Dabei wird SGK1 aktiviert, die die Ubiquitinierung des ENaCs durch Nedd4-2 inhibiert, was eine erhöhte Expression des Kanals zur Folge hat. Das TIP-Peptid AP318 liefert eine steigende Aktivität des Signalwegs bis zu 120 Minuten, wobei die erhöhte Aktivität nach 60 Minuten sich nicht wesentlich ändert.

Abbildungsverzeichnis

- [1] Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases (Hanukoglu und Hanukoglu, 2016)
- [2] Mechanisms of ENaC Regulation and Clinical Implications (Bhalla et al.,2008)
- [3] Serum and Glucocorticoid Regulated Kinase 1 in Sodium Homeostasis (Yiyun et al.,2016)
- [4] Mini-Review: Novel Therapeutic Strategies to Blunt Actions of Pneumolysin in the Lungs (Lucas et al.,2013)
- [5] Restoration of Epithelial Sodium Channel Function by Synthetic Peptides in Pseudohypoaldosteronism Type 1B Mutants; Willam et al.,2017
- [6] Restoration of Epithelial Sodium Channel Function by Synthetic Peptides in Pseudohypoaldosteronism Type 1B Mutants (Willam et al.,2017)
- [7] Essential structural features of TNF- α lectin-like domain derived peptides for activation of amiloride-sensitive sodium current in A549 cells (Hazemi et al.,2010)
- [8] schematische Darstellung der verwendeten 96 Mikrotiterplatte
- [9] schematische Darstellung der Probestaschen auf mehreren Gele
- [10] Elektrophoresekammer während der Auftrennung
- [11] Ablauf der Entwicklung in der Dunkelkammer

[12] Western Blot von SGK p-Serin 422 mit Loading Control

[13] Ergebnisse von SGK p-Serin 422

[14] Western Blot von SGK p-Serin 78 mit Loading Control

[15] Ergebnisse von SGK p-Serin 78

[16] Western Blot von SGK (C-Term.) mit Loading Control

[17] Ergebnisse von SGK (C-Term.)

[18] Western Blot von SGK (N-Term.) mit Loading Control

[19] Ergebnisse von SGK (N-Term.)

[20] Western Blot von Anti phospo SGK 1 mit Loading Control

[21] Ergebnisse von Anti phospo SGK 1

Literaturverzeichnis

Adachi M, Asakura Y, Muroya K, Tajima T, Fujieda K, Kuribayashi E, Uchida S. *Increased Na reabsorption via the Na-Cl cotransporter in autosomal recessive pseudohypoaldosteronism*. Clin Exp Nephrol., 2010,14(3):p.228-32

Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J., *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro*. Curr Biol., 1998, 8(2):p.69-81

Bangel-Ruland N, Sobczak K, Christmann T, Kentrup D, Langhorst H, Kusche-Vihrog K, Weber WM., *Characterization of the epithelial sodium channel delta-subunit in human nasal epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol., 2010, 42(4):p.498-505

Bhalla V, Daidié D, Li H, Pao AC, LaGrange LP, Wang J, Vandewalle A, Stockand JD, Staub O, Pearce D, *Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 regulates ubiquitin ligase neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated protein 4-2 by inducing interaction with 14-3-3*. Mol Endocrinol., 2005, 19(12):p.3073-84

Bhalla V, Hallows KR., *Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications*. J Am Soc Nephrol., 2008, 19(10):p.1845-54

Bhargava A, Pearce D., *Mechanisms of mineralocorticoid action: determinants of receptor specificity and actions of regulated gene products*. Trends Endocrinol Metab., 2004, 15(4):p.147-53

Bogdanović R, Kuburović V, Stajić N, Mughal SS, Hilger A, Ninić S, Prijić S, Ludwig M., *Liddle syndrome in a Serbian family and literature review of underlying mutations*. Eur J Pediatr., 2012,171(3):471-8

Braun C, Hamacher J, Morel DR, Wendel A, Lucas R., *Dichotomal role of TNF in experimental pulmonary edema reabsorption*. J Immunol., 2005,175(5):p.3402-8.

Büsst CJ, *Blood pressure regulation via the epithelial sodium channel: from gene to kidney and beyond*. Clin Exp Pharmacol Physiol., 2013, 40(8):p.495-503

Butterworth Michael B., Robert S. Edinger, Raymond A. Frizzell, and John P. Johnson, *Regulation of the epithelial sodium channel by membrane trafficking*. Am J Physiol Renal Physiol., 2009, 296(1): F10–F24

Chang SS, Grunder S, Hanukoglu A, Rösler A, Mathew PM, Hanukoglu I, Schild L, Lu Y, Shimkets RA, Nelson-Williams C, Rossier BC, Lifton RP., *Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1*. Nat Genet., 1996,12(3):p.248-53

Cheek DB, Perry JW. *A salt wasting syndrome in infancy*. Arch Dis Child., 1958, 33(169):252-6

Czikora I, Alli A, Bao HF, Kaftan D, Sridhar S, Apell HJ, Gorshkov B, White R, Zimmermann A, Wendel A, Pauly-Evers M, Hamacher J, Garcia-Gabay I, Fischer B, Verin A, Bagi Z, Pittet JF, Shabbir W, Lemmens-Gruber R, Chakraborty T, Lazrak A, Matthay MA, Eaton DC, Lucas R., *A novel tumor necrosis factor-mediated mechanism of direct epithelial sodium channel activation*. Am J Respir Crit Care Med., 2014,190(5):p.522-32

Dagenais A, Fréchette R, Yamagata Y, Yamagata T, Carmel JF, Clermont ME, Brochiero E, Massé C, Berthiaume Y., *Downregulation of ENaC activity and expression by TNF-alpha in alveolar epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 2004,286(2):L301-11

Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Münster C, Chraïbi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, Staub O, *Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression*. EMBO J., 2001, 20(24):p.7052-9

Declercq W, Denecker G, Fiers W, Vandenabeele P. *Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75*. J Immunol., 1998,161(1):p.390-9

Diakov A, Korbmacher C., *A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's alpha-subunit*. J Biol Chem., 2004,279(37):38134-42

Eastwood AL, Goodman MB., *Insight into DEG/ENaC channel gating from genetics and structure*. Physiology (Bethesda), 2012, 27(5): p.282-90

Eaton DC, Helms MN, Koval M, Bao HF, Jain L., *The contribution of epithelial sodium channels to alveolar function in health and disease*. Annu Rev Physiol., 2009, 71:p.403-23

Edelheit O, Hanukoglu I, Gizewska M, Kandemir N, Tenenbaum-Rakover Y, Yurdakök M, Zajaczek S, Hanukoglu A. *Novel mutations in epithelial sodium channel (ENaC) subunit genes and phenotypic expression of multisystem pseudohypoaldosteronism*. Clin Endocrinol (Oxf)., 2005,62(5):p.547-53

Egli M, Duplain H, Lepori M, Cook S, Nicod P, Hummler E, Sartori C, Scherrer U., *Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice*. J Physiol., 2004, 560(Pt 3):p.857-65

Findling JW, Raff H, Hansson JH, Lifton RP., *Liddle's syndrome: prospective genetic screening and suppressed aldosterone secretion in an extended kindred*. J Clin Endocrinol Metab., 1997, 82(4):1071-4

Firsov D, Gautschi I, Merillat AM, Rossier BC, Schild L., *The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC)*. EMBO J., 1998, 17(2):p.344-52

Fischbarg J, *Fluid transport across leaky epithelia: central role of the tight junction and supporting role of aquaporins*. Physiol Rev., 2010, 90(4):p.1271-90

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC., *Phosphoinositide kinases*. Annu Rev Biochem., 1998, 67:p.481-507

Fukuda N, Jayr C, Lazrak A, Wang Y, Lucas R, Matalon S, Matthay MA., *Mechanisms of TNF- α stimulation of amiloride-sensitive sodium transport across alveolar epithelium*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 2001, 280(6):L1258-65

Furuhashi M, Kitamura K, Adachi M, Miyoshi T, Wakida N, Ura N, Shikano Y, Shinshi Y, Sakamoto K, Hayashi M, Satoh N, Nishitani T, Tomita K, Shimamoto K., *Liddle's syndrome caused by a novel mutation in the proline-rich PY motif of the epithelial sodium channel beta-subunit*. J Clin Endocrinol Metab., 2005, 90(1):p.340-4

Garty H, Palmer LG., *Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation*. Physiol Rev., 1997, 77(2):p.359-96

Giraldez T, Rojas P, Jou J, Flores C, Alvarez de la Rosa D., *The epithelial sodium channel δ -subunit: new notes for an old song*. Am J Physiol Renal Physiol., 2012, 303(3):p.328-38

Greig ER, Mathialahan T, Boot-Handford RP, Sandle GI., *Molecular and functional studies of electrogenic Na(+) transport in the distal colon and rectum of young and elderly subjects*. Gut., 2003, 52(11):p.1607-15

Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, Canessa C, Iwasaki T, Rossier B, Lifton RP., *Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome.*, Nat Genet., 1995, 11(1):p.76-82.

Hanukoglu A, Bistrizter T, Rakover Y, Mandelberg A., *Pseudohypoaldosteronism with increased sweat and saliva electrolyte values and frequent lower respiratory tract infections mimicking cystic fibrosis*. J Pediatr., 1994, 125(5 Pt 1):p.752-5

Hanukoglu A, Hanukoglu I., *Clinical improvement in patients with autosomal recessive pseudohypoaldosteronism and the necessity for salt supplementation*. Clin Exp Nephrol., 2010, 14(5):p.518-9

Hanukoglu A, Hanukoglu I., *Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases*. Gene, 2016, 579(2): p.95–132.

Hanukoglu A, *Type I pseudohypoaldosteronism includes two clinically and genetically distinct entities with either renal or multiple target organ defects.* J Clin Endocrinol Metab., 1991, 73(5):p.936-44.

Hazemi P, Tzotzos SJ, Fischer B, Andavan GS, Fischer H, Pietschmann H, Lucas R, Lemmens-Gruber R., *Essential structural features of TNF- α lectin-like domain derived peptides for activation of amiloride-sensitive sodium current in A549 cells.* J Med Chem., 2010, 53(22):p.8021-9

Hiltunen TP, Hannila-Handelberg T, Petäjämäki N, Kantola I, Tikkanen I, Virtamo J, Gautschi I, Schild L, Kontula K., *Liddle's syndrome associated with a point mutation in the extracellular domain of the epithelial sodium channel gamma subunit.* J Hypertens., 2002, 20(12):p.2383-90

Hogg RJ, Marks JF, Marver D, Frolich JC. *Long term observations in a patient with pseudohypoaldosteronism.* Pediatr Nephrol., 1991,5(2):p.205-10

Johnson MD, Bao HF, Helms MN, Chen XJ, Tigue Z, Jain L, Dobbs LG, Eaton DC, *Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport.* Proc Natl Acad Sci U S A., 2006, 103(13):p.4964-9

Kashlan OB, Adelman JL, Okumura S, Blobner BM, Zuzek Z, Hughey RP, Kleyman TR, Grabe M., *Constraint-based, homology model of the extracellular domain of the epithelial Na⁺ channel α subunit reveals a mechanism of channel activation by proteases.* J Biol Chem., 2011, 286(1):p.649-60

Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD., *Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer.* Annu Rev Cell Dev Biol., 2001, 17:p.615-75

Kellenberger S, Schild L., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na⁺ channel.* Pharmacol Rev., 2005, 67(1): p.1-35. doi: 10.1124

Kerem E, Bistrizter T, Hanukoglu A, Hofmann T, Zhou Z, Bennett W, MacLaughlin E, Barker P, Nash M, Quittell L, Boucher R, Knowles MR. *Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoaldosteronism.* N Engl J Med., 1999,341(3):p.156-62.

Konstas AA, Korbmacher C., *The gamma-subunit of ENaC is more important for channel surface expression than the beta-subunit.* Am J Physiol Cell Physiol., 2003, 284(2):p.447-56.

Kreda SM, Gynn MC, Fenstermacher DA, Boucher RC, Gabriel SE., *Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung.* Am J Respir Cell Mol Biol., 2001, 24(3):p.224-34

Krueger B, Schlötzer-Schrehardt U, Haerteis S, Zenkel M, Chankiewicz VE, Amann KU, Kruse FE, Korbmayer C., *Four subunits ($\alpha\beta\gamma\delta$) of the epithelial sodium channel (ENaC) are expressed in the human eye in various locations*. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2012, 53(2):p.596-604

Lee IH, Campbell CR, Cook DI, Dinudom A., *Regulation of epithelial Na⁺ channels by aldosterone: role of Sgk1*. Clin Exp Pharmacol Physiol., 2008, 35(2):p.235-41

Liddle GW, Bledsoe T, Coppage WS Jr. *A familial renal disorder simulating primary aldosteronism but with negligible aldosterone secretion*. Trans Assoc Am Physicians, 1963,76:199-213

Loffing J, Schild L., *Functional domains of the epithelial sodium channel*. J Am Soc Nephrol., 2005, 16(11):p.3175-81

Lu C, Pribanic S, Debonneville A, Jiang C, Rotin D., *The PY motif of ENaC, mutated in Liddle syndrome, regulates channel internalization, sorting and mobilization from subapical pool*. Traffic., 2007,8(9):p.1246-64

Lucas R, Magez S, De Leys R, Fransen L, Scheerlinck JP, Rampelberg M, Sablon E, De Baetselier P., *Mapping the lectin-like activity of tumor necrosis factor*. Science., 1994,263(5148):p.814-7

Lucas R, Yue Q, Alli A, Duke BJ, Al-Khalili O, Thai TL, Hamacher J, Sridhar S, Lebedyeva I, Su H, Tzotzos S, Fischer B, Gameiro AF, Loose M, Chakraborty T, Shabbir W, Aufy M, Lemmens-Gruber R, Eaton DC, Czikora I. *The Lectin-like Domain of TNF Increases ENaC Open Probability through a Novel Site at the Interface between the Second Transmembrane and C-terminal Domains of the α -Subunit*. J Biol Chem., 2016, 291(45):p.23440-23451

Manning BD, Cantley LC., *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell., 2007,129(7):p.1261-74

Martinerie L, Pussard E, Foix-L'Hélias L, Petit F, Cosson C, Boileau P, Lombès M., *Physiological partial aldosterone resistance in human newborns*. Pediatr Res., 2009,66(3):p.323-8

Matsuda S, Kobayashi M, Kitagishi Y., *Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.*, ISRN Endocrinol., 2013, 472432. doi: 10.1155/2013/472432

Parameswaran N, Patial S., *Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr., 2010, 20(2):87-103

Ridge K.M., W. G. Olivera, F. Saldias, Z. Azzam, S. Horowitz, D. H. Rutschman, V. Dumasius, P. Factor, J. I. Sznajder, *Alveolar type 1 cells express the $\alpha 2$ Na,K-ATPase, which contributes to lung liquid clearance*. Circulation Research, 2003; 92(4): p.453-460

Riepe FG, Finkeldei J, de Sanctis L, Einaudi S, Testa A, Karges B, Peter M, Viemann M, Grötzinger J, Sippell WG, Fejes-Toth G, Krone N. *Elucidating the underlying molecular pathogenesis of NR3C2 mutants causing autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1*. J Clin Endocrinol Metab., 2006, 91(11):p.4552-61

Riepe FG, van Bemmelen MX, Cachat F, Plendl H, Gautschi I, Krone N, Holterhus PM, Theintz G, Schild L., *Revealing a subclinical salt-losing phenotype in heterozygous carriers of the novel S562P mutation in the alpha subunit of the epithelial sodium channel*. Clin Endocrinol (Oxf)., 2009, 70(2):p.252-8.

Riepe FG, van Bemmelen MX, Cachat F, Plendl H, Gautschi I, Krone N, Holterhus PM, Theintz G, Schild L. *Revealing a subclinical salt-losing phenotype in heterozygous carriers of the novel S562P mutation in the alpha subunit of the epithelial sodium channel*. Clin Endocrinol (Oxf)., 2009, 70(2):p.252-8

Rossier BC, Baker ME, Studer RA., *Epithelial sodium transport and its control by aldosterone: the story of our internal environment revisited*. Physiol Rev., 2015, 95(1):p.297-340

Ruderman NB, Kapeller R, White MF, Cantley LC., *Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1990, 87(4):p.1411-5

Schaedel C, Marthinsen L, Kristoffersson AC, Kornfält R, Nilsson KO, Orlenius B, Holmberg L. *Lung symptoms in pseudohypoaldosteronism type 1 are associated with deficiency of the alpha-subunit of the epithelial sodium channel*. J Pediatr., 1999, 135(6):p.739-45

Schild L, Lu Y, Gautschi I, Schneeberger E, Lifton RP, Rossier BC., *Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome*. EMBO J., 1996, 15(10):p.2381-7

Schwameis R, Eder S, Pietschmann H, Fischer B, Mascher H, Tzotzos S, Fischer H, Lucas R, Zeitlinger M, Hermann R.A, *FIM study to assess safety and exposure of inhaled single doses of AP301-A specific ENaC channel activator for the treatment of acute lung injury*. J Clin Pharmacol., 2014, 54(3):341-50

Shabbir W, Scherbaum-Hazemi P, Tzotzos S, Fischer B, Fischer H, Pietschmann H, Lucas R, Lemmens-Gruber R., *Mechanism of action of novel lung edema therapeutic AP301 by activation of the epithelial sodium channel*. Mol Pharmacol., 2013, 84(6):p.899-910

Shah BH, Neithardt A, Chu DB, Shah FB, Catt KJ, *Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs*. J Cell Physiol., 2006, 206(1):p.47-57.

Sheng S, Li J, McNulty KA, Kieber-Emmons T, Kleyman TR., *Epithelial sodium channel pore region. structure and role in gating.*, J Biol Chem., 2001, 276(2):p.1326-34

Sherblom AP, Decker JM, Muchmore AV., *The lectin-like interaction between recombinant tumor necrosis factor and uromodulin*. J Biol Chem., 1988, 263(11):p.5418-24

Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr, Ulick S, Milora RV, Findling JW, et al., *Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel*., Cell., 1994, 79(3):p.407-14.

Sluka KA, Winter OC, Wemmie JA., *Acid-sensing ion channels: A new target for pain and CNS diseases*. Curr Opin Drug Discov Devel., 2009, 12(5):p.693-704.

Stockand JD, Staruschenko A, Pochynyuk O, Booth RE, Silverthorn DU., *Insight toward epithelial Na⁺ channel mechanism revealed by the acid-sensing ion channel 1 structure*. IUBMB Life., 2008, 60(9):p.620-8

Strautnieks SS, Thompson RJ, Hanukoglu A, Dillon MJ, Hanukoglu I, Kuhnle U, Seckl J, Gardiner RM, Chung E., *Localisation of pseudohypoaldosteronism genes to chromosome 16p12.2-13.11 and 12p13.1-pter by homozygosity mapping*. Hum Mol Genet., 1996,5(2):p.293-9

Tang P, Hung M-C, Klostergaard J., *Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer*. Biochemistry., 1996, 35(25):p.8216-25

Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W., *Two tumour necrosis factor receptors: structure and function*. Trends Cell Biol., 1995, 5(10):p.392-9.

Voilley N, Bassilana F, Mignon C, Merscher S, Mattéi MG, Carle GF, Lazdunski M, Barbry P., *Cloning, chromosomal localization, and physical linkage of the beta and gamma subunits (SCNN1B and SCNN1G) of the human epithelial amiloride-sensitive sodium channel*. Genomics., 1995, 28(3):p.560-5

Voilley N¹, Lingueglia E, Champigny G, Mattéi MG, Waldmann R, Lazdunski M, Barbry P., *The lung amiloride-sensitive Na⁺ channel: biophysical properties, pharmacology, ontogenesis, and molecular cloning*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1994, 91(1):p.247-51.

Waldmann R, Lazdunski M., *H(+)-gated cation channels: neuronal acid sensors in the NaC/DEG family of ion channels*. Curr Opin Neurobiol., 1998, 8(3): p.418-424

Wang LP, Yang KQ, Jiang XJ, Wu HY, Zhang HM, Zou YB, Song L, Bian J, Hui RT, Liu YX, Zhou XL, *Prevalence of Liddle Syndrome Among Young Hypertension Patients of Undetermined Cause in a Chinese Population*. J Clin Hypertens (Greenwich)., 2015,17(11):p.902-7

Willam A, Aufy M, Tzotzos S, Evanzin H, Chytrcek S, Geppert S, Fischer B, Fischer H, Pietschmann H, Czikora I, Lucas R, Lemmens-Gruber R, Shabbir W., *Restoration of Epithelial Sodium Channel Function by Synthetic Peptides in Pseudohypoaldosteronism Type 1B Mutants*. Front Pharmacol., 2017, 8:85.

Yamagata T, Yamagata Y, Nishimoto T, Hirano T, Nakanishi M, Minakata Y, Ichinose M, Dagenais A, Berthiaume Y., *The regulation of amiloride-sensitive epithelial sodium channels by tumor necrosis factor-alpha in injured lungs and alveolar type II cells*. Respir Physiol Neurobiol., 2009, 166(1):p.16-23

Yiyun Lou, Fan Zhang, Yuqin Luo, Liya Wang, Shisi Huang, and Fan Jin, *Serum and Glucocorticoid Regulated Kinase 1 in Sodium Homeostasis*, Int J Mol Sci., 2016, 17(8): p.1307

Zennaro MC, Borensztein P, Jeunemaitre X, Armanini D, Corvol P, Soubrier F., *Molecular characterization of the mineralocorticoid receptor in pseudohypoaldosteronism*. Steroids., 1995, 60(1):p.164-7.

Zhou R, Patel SV, Snyder PM., *Nedd4-2 catalyzes ubiquitination and degradation of cell surface ENaC*. J Biol Chem., 2007, 282(28):p.20207-12