

**Der epitheliale Natrium-Kanal (ENaC):
Regulation des corticosteroidinduzierten Natriumtransports
durch pro-inflammatorische Zytokine**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Theresa Bergann
aus Berlin

September 2009

Diese Arbeit wurde von Mai 2006 bis September 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke an der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke, Charité-Universitätsmedizin Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Disputation am 4. 12. 2009

INHALT

Inhaltsverzeichnis I-IV

1 Einleitung 1

1. 1	Die Regulation des Natriumhaushalts	1
1. 2	Der epitheliale Natrium-Kanal ENaC	3
1. 3	Molekulare Zusammensetzung des ENaC	4
1. 4	Transkriptionelle Regulation des ENaC	6
1. 4. 1	Regulation durch Corticosteroidrezeptoren	7
	(I) Der Mineralocorticoidrezeptor	8
	(II) Der Glucocorticoidrezeptor	10
1. 4. 2	Regulation durch Butyrat	12
1. 5	Regulation des ENaC-Targetings	13
1. 5. 1	Regulation durch SGK-1	15
1. 5. 2	Regulation durch GILZ	15
1. 6	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	16
1. 6. 1	Rolle pro-inflammatorischer Zytokine bei CED	18
1. 7	ENaC-Dysregulation bei CED	19
1. 8	Existierende Modelle zur Charakterisierung der CED-Pathogenese	20
1. 9	Zielsetzung der Arbeit	22

2 Material und Methoden 23

2. 1	Material und Geräte	23
2. 1. 1	Verbrauchsmaterial	23
2. 1. 2	Geräte	23
2. 1. 3	Software	24
2. 2	Reagenzien	25
2. 2. 1	Laborchemikalien und andere Reagenzien	25
2. 2. 2	Inhibitoren	27
2. 2. 3	Zytokine und Enzyme	27
2. 2. 4	Verwendete Kits	28
2. 2. 5	Antikörper	28
2. 3	Kultivierung eukaryotischer Zellen	29
2. 3. 1	Verwendete Zelllinien und Kulturmedien	29

2. 3. 2	Zellkultur-Epithelmodell	29
2. 3. 3	Zugabe von Reagenzien zu eukaryotischen Zellkulturen	30
2. 3. 4	Generierung stabil transfizierter Zellklone mittels Nukleofektion	30
2. 3. 5	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofektion und Reporter-Gen-Assay	31
2. 4	Molekularbiologische Methoden	32
2. 4. 1	Klonierungsstrategie zur Generierung des Reporterplasmids pcDNA3.1(+)-Luc	32
2. 4. 2	Klonierungsstrategie zur Generierung des Expressionsplasmids pTRE2hyg-hMR	33
2. 4. 3	Restriktionsverdau	33
2. 4. 4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	34
2. 4. 5	Agarosegel-Elektrophorese und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	34
2. 4. 6	Dephosphorylierung von linearisierter DNA und Ligation	34
2. 4. 7	Transformation chemisch kompetenter E. coli	35
2. 4. 8	Isolierung von Plasmid-DNA	35
2. 4. 9	PCR und Sequenzierung der Konstrukte	35
2. 4. 10	Glycerolstocks	36
2. 4. 11	RNA-Isolierung	36
2. 4. 12	Reverse Transkription und Real-time PCR	36
2. 5	Proteinchemische Methoden	37
2. 5. 1	Gewinnung von Zelllysaten	37
2. 5. 2	Konzentrationsbestimmungen von Protein-Lösungen	38
2. 5. 3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2. 5. 4	Western Blot-Analyse	40
2. 6	Elektrophysiologische Methoden	40
2. 6. 1	Die Ussing-Technik	40
2. 6. 2	Ermittlung des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms in der Ussing-Kammer	42
2. 6. 2. 1	Elektrophysiologische Messungen an humanen Colonzelllinien	43
2. 6. 2. 2	Elektrophysiologische Messungen an distalem Rattencolon	43
2. 7	Immunologische Methoden	45
2. 7. 1	Immunfluoreszenz-Färbung	45
2. 8	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	46
2. 9	Statistische Analysen	46

3 Ergebnisse 47

- 3. 1 Modulation des Glucocorticoid-induzierten elektrogenen Na⁺-Transports durch pro-inflammatorische Zytokine 47
 - 3. 1. 1 Regulation des ENaC durch TNF- α und Dexamethason im distalen Rattencolon 47
 - 3. 1. 2 Regulation des ENaC durch TNF- α und Dexamethason in humanen Colonzellen 50
 - 3. 1. 3 Charakterisierung von ENaC-Promotoraktivität und Glucocorticoid-rezeptor (GR)-Transaktivierung 53
 - 3. 1. 4 Proteinexpression und subzelluläre Lokalisation des GR 55
 - 3. 1. 5 Regulation von mRNA-Niveau und -Halblebenszeit des GR- α durch TNF- α 58
 - 3. 1. 6 Charakterisierung der beteiligten TNF- α -abhängigen Signalwege 60
 - 3. 1. 7 Wechselwirkung weiterer bei CED relevanter Zytokine mit Glucocorticoid-vermittelten Effekten 63
- 3. 2 Charakterisierung eines Aldosteron-sensitiven epithelialen Modells humaner Colonzellen 65
 - 3. 2. 1 Generierung einer MR-exprimierenden epithelialen Colonzelllinie 65
 - 3. 2. 2 Aldosteron-vermittelte ENaC-Induktion in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen 67
 - 3. 2. 3 Einfluss von Butyrat auf Protein- und mRNA-Expressionsniveau des MR 71
 - 3. 2. 4 Regulation der MR-abhängigen Transaktivierung durch Butyrat und Aldosteron 73
 - 3. 2. 5 ENaC-Expressionsniveau und -Aktivität in der apikalen Membran unter Aldosteron und Butyrat 75

4 Diskussion 80

- 4. 1 Wechselwirkung von Glucocorticoiden und TNF- α bei der Regulation des elektrogenen Na⁺-Transports 80
 - 4. 1. 1 Synergismus von Dexamethason und TNF- α bei der Induktion des ENaC 80
 - 4. 1. 2 Steigerung des GR-Expressionsniveaus durch TNF- α 81

4. 1. 3	Wechselwirkung der Glucocorticoid- und TNF- α -abhängigen Signaltransduktion	85
4. 1. 4	Bedeutung des Synergismus von GC und TNF- α für CED	88
4. 1. 5	Wechselwirkung weiterer CED-Zytokine mit der GC-vermittelten Signaltransduktion	90
4. 2	Charakterisierung des Aldosteron-induzierten elektrogenen Na ⁺ -Transports via ENaC im Zellmodell	92
4. 2. 1	Generierung eines MR-exprimierenden epithelialen Modells humaner Colonzellen	92
4. 2. 2	Steigerung des MR-Expressionsniveaus durch Butyrat	94
4. 2. 3	Zusammenspiel von Butyrat und Mineralocorticoiden beim ENaC- Targeting	96
5	Zusammenfassung	102
6	Summary	104
7	Literatur	105
8	Abkürzungsverzeichnis	126
9	Anhang	129
	Publikationen	129
	Lebenslauf	131
	Danksagung	132

1 EINLEITUNG

1.1 Die Regulation des Natriumhaushalts

Die Elektrolyt- und Wasserhomöostase des Organismus ist von essentieller Bedeutung für die Gewährleistung einer Vielzahl zellulärer Vorgänge. Der Grund dafür liegt in der Abhängigkeit zahlreicher Zellfunktionen von einem komplexen Elektrolytgleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärer Seite der Zellmembran. Durch den regulierten Molekültransport über die Zellmembran wird die Generierung der erforderlichen elektrochemischen Gradienten ermöglicht. Dieser Transport wird von spezifischen Proteinen vermittelt, welche ihrerseits einer strengen Regulation unterliegen.

Das anorganische Ion Natrium (Na^+) nimmt hinsichtlich der Kontrolle von Transportvorgängen und auch des Elektrolythaushalts insgesamt eine besondere Stellung ein. Nach Kalzium (Ca^{2+}) und Kalium (K^+) ist es das dritthäufigste anorganische Ion im menschlichen Körper. Seine Konzentration im Serum bleibt trotz schwankender Zufuhr mit der Nahrung durch eine fein abgestimmte Regulation der renalen und intestinalen Resorption konstant. Na^+ ist für die Generierung von elektrochemischen Gradienten über der Zellmembran unter Beteiligung von K^+ und Chlorid (Cl^-) ausschlaggebend, von denen der Transport der meisten anderen Substanzen abhängt. Es bildet sich bezogen auf Na^+ ein Konzentrationsgefälle von 140 mM extrazellulär zu 14 mM intrazellulär aus (Hierholzer & Fromm, 1997). Im Zusammenhang mit den im Magen-Darm-Trakt stattfindenden Resorptionprozessen liefert dieser Gradient z.B. im Dünndarm die Energie für die Resorption von Monosacchariden und Aminosäuren, welche im Symport mit Na^+ stattfindet. In vielen Fällen werden auch sekundäre Gradienten durch Austausch mit Natriumionen erzeugt, welche dann wiederum den Transport weiterer Moleküle antreiben. Weiterhin ermöglicht der Na^+ -Konzentrationsgradient im Zusammenspiel mit den Gradienten der Ionen K^+ und Ca^{2+} und dem sich daraus ergebenden Membranpotential die neuronale Propagation von Aktionspotentialen.

Bezogen auf den Gesamtorganismus trägt die Niere die Hauptlast der Regulation der Elektrolytbilanz. Parallel hierzu wird aber auch die intestinale Resorption bzw. Ausscheidung von Elektrolyten reguliert. Dabei dominieren hinsichtlich der Na^+ -Resorption im proximalen Tubulus der Niere wie auch im Dünndarm und proximalen Colon der elektroneutrale Antiport gegen H^+ und der Symport mit Monosacchariden oder Aminosäuren über die apikale Membran (Kiela *et al.*, 2006). Hingegen herrscht im spät-distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere sowie im distalen Colon der elektrogene Natriumtransport über den epithelialen Natrium-Kanal (ENaC) vor (Kunzelmann & Mall, 2002). Die treibende Kraft für diese Vorgänge wird von der basolateral gelegenen Na^+/K^+ -ATPase geliefert, welche pro Hydrolyse eines ATP-Moleküls drei Natriumionen im Austausch für zwei Kaliumionen aus der Zelle ausschleust (Faller, 2008). Der Hauptregulator der Na^+ -Homöostase ist das

Mineralocorticoidhormon Aldosteron, welches am Ende der Signalkaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) steht, die zur Steigerung des Blutdrucks aktiviert wird (Abb. 1. 1).

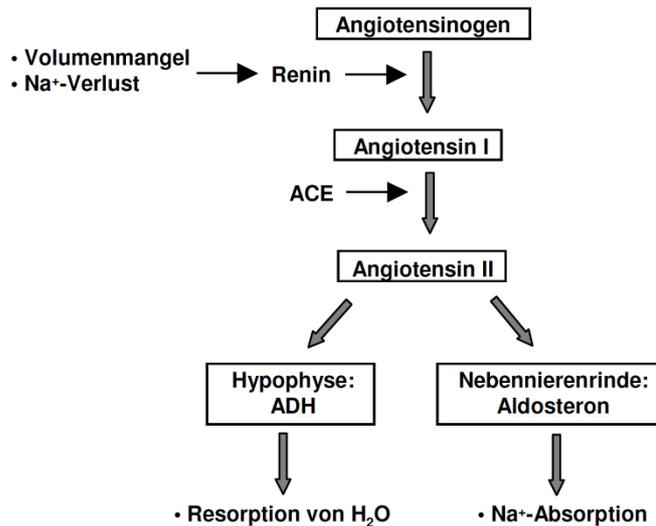


Abb. 1. 1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Die Endopeptidase Renin wird bei Volumenmangel oder Natriumverlust von der Niere ausgeschüttet und spaltet das aus der Leber stammende Prohormon Angiotensinogen. Das entstehende Angiotensin I wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) aus Nierenendothelzellen zu Angiotensin II (AT II) gespalten, welches in der Nebennierenrinde die Freisetzung von Aldosteron stimuliert. Weiter induziert AT II die Vasokonstriktion von Blutgefäßen und löst in der Hypophyse die Freisetzung des Antidiuretischen Hormons (ADH) aus, das über Aquaporine eine vermehrte Wasserresorption im Sammelrohr der Niere verursacht.

In den Mineralocorticoid-sensitiven Epithelien des Colons, des Nephrons und der Speichel- und Schweißdrüsen steigert Aldosteron über die Aktivierung des Mineralocorticoidrezeptors (MR) die Na⁺-Resorption durch Induktion des epithelialen Natrium-Kanals (ENaC) (Kellenberger & Schild, 2002). Durch die Aktivität des ENaC wird daraufhin eine erhöhte Resorption von Na⁺ aus Fäzes, Primärharn und Drüsenflüssigkeiten gewährleistet. Im distalen Colon wird die Konzentration von Na⁺ in den Fäzes auf diese Weise feinreguliert und auf weniger als 5 mM gesenkt (Fromm & Hegel, 1987), während die durchschnittliche Konzentration in der zugeführten Nahrung bei ca. 60 mM liegt (Young *et al.*, 1996). Neben dem ENaC selbst reguliert Aldosteron u.a. auch die basolaterale Na⁺/K⁺-ATPase sowie apikale K⁺-Kanäle (Abb. 1. 2) (Beesley *et al.*, 1998; Kolla & Litwack, 2000b; Sorensen *et al.*, 2008).

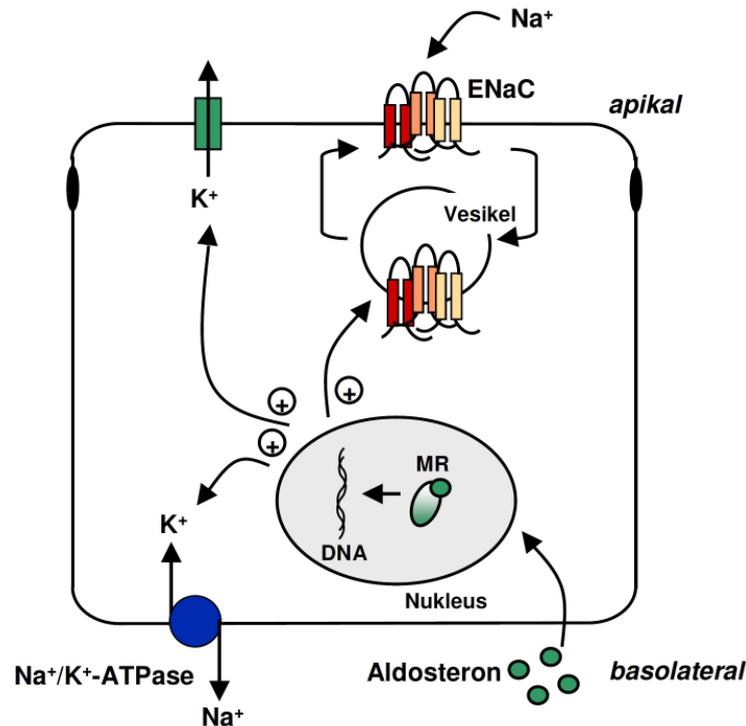


Abb. 1. 2: Induktion des elektrogenen Na^+ -Transports durch Aldosteron. Das lipophile Mineralocorticoid Aldosteron gelangt durch Diffusion durch die Zellmembran und aktiviert den Mineralocorticoidrezeptor (MR). Durch MR-abhängige Transaktivierung wird die Expression von Genen gesteigert, die am elektrogenen Na^+ -Transport beteiligt sind. Dazu zählen u. a. ENaC, die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase und apikale K^+ -Kanäle (modifiziert nach: Snyder, 2002).

Transepitheliale Transportvorgänge können durch intestinale Entzündungsprozesse beeinflusst werden. Dies kann mit einer Störung der epithelialen Barrierefunktion, der Steigerung sekretorischer Prozesse und einer Verminderung von Resorptionsvorgängen verbunden sein (Martinez-Augustin *et al.*, 2009). Die entstehende Diarrhoe bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wurde dabei unter anderem auf die Beeinträchtigung der Na^+ -Resorption zurückgeführt (Bürgel *et al.*, 2002; Greig & Sandle, 2000; Sandle *et al.*, 1990). Es wurde gezeigt, dass in diesem Zusammenhang sowohl die elektroneutrale als auch die elektrogene Na^+ -Resorption über den ENaC in ihrer Funktion gestört sind (Amasheh *et al.*, 2004; Barmeyer *et al.*, 2002, Zeissig *et al.*, 2008). Auf die zugrunde liegenden Mechanismen wird in Abschnitt 1. 7 eingegangen.

1. 2 Der epitheliale Natrium-Kanal ENaC

Der epitheliale Natrium-Kanal (ENaC, *Sodium Channel Non-neuronal 1 / SCNN1*) wird in der apikalen Membran zahlreicher Salz-resorbierender Epithelien exprimiert. Er gehört zur Superfamilie der Amilorid-sensitiven, spannungsunabhängigen ENaC-Deg-Ionenkanäle. Namensgebend für diese Ionenkanalfamilie waren die sog. Degenerine, Ionenkanäle, die im

Zusammenhang mit der Mechanotransduktion in *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurden (Chalfie & Wolinsky, 1990). Weiterhin zählen dazu auch die Protonen-aktivierten *Acid-sensing Ion Channels* (ASICs), welche im Nervensystem von Säugetieren an der Detektion und Weiterleitung sensorischer Information beteiligt sind (Kellenberger & Schild, 2002).

Beim Einstrom über den ENaC gelangen die Na⁺-Ionen nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion in die Zelle. Für den elektrogenen Na⁺-Transport stellt der ENaC dabei den limitierenden Faktor dar, da seine Induktion das finale Element der oben beschriebenen RAAS-Kaskade repräsentiert. Somit ist ENaC in die Kontrolle des Gesamt-Salzhaushaltes in allen Mineralocorticoid-sensitiven Epithelien wie dem distalen Colon und dem distalen Nephron (Tubulus und Sammelrohr der Niere) involviert. Das Mineralocorticoidhormon Aldosteron induziert dabei die Expression der einzelnen ENaC-Untereinheiten und beeinflusst außerdem das Niveau der in der apikalen Membran lokalisierten ENaC-Moleküle (Verrey, 1999). Mineralocorticoide stellen allerdings nicht die einzigen Corticosteroide dar, die den ENaC regulieren. So wurde auch für Glucocorticoide eine mit Mineralocorticoiden vergleichbare Wirkung nachgewiesen, die über eine Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors vermittelt wird (Asher *et al.*, 1996). Die Induktion des ENaC kann dabei auch als ein kompensatorischer Mechanismus interpretiert werden, der im Falle von Elektrolytverlust und Diarrhoe einsetzt. So wurde bei der Untersuchung der Na⁺/H⁺-Exchanger 3 (NHE3)-*knockout*-Maus, deren Phänotyp eine Diarrhoe aufweist, eine kompensatorische Induktion der ENaC-Aktivität nachgewiesen (Schultheis *et al.*, 1998). NHE3 vermittelt im Dünndarm und proximalen Colon den elektroneutralen Antiport von Na⁺ gegen Protonen.

Genetisch bedingte Fehlfunktionen des ENaC sind mit der Entstehung des Liddle-Syndroms und des Pseudohypoaldosteronismus Typ I (PHA-I) verknüpft. Das zum ersten Mal 1963 beschriebene autosomal dominante Liddle-Syndrom ist eine Salz-sensitive Bluthochdruckerkrankung, der *gain of function*-Mutationen in den ENaC-Untereinheiten β und γ zugrunde liegen (Goulet *et al.*, 1998; Liddle *et al.*, 1963). Im Gegensatz dazu sind die wichtigsten Symptome des autosomal rezessiven PHA-I eine metabolische Azidose und Hyperkaliämie. Dies kommt durch eine verringerte Responsivität der Nieren auf Aldosteron zustande, die ihre Ursache in *loss of function*-Mutationen der ENaC-Untereinheiten hat, welche zu trunkeierten Proteinketten führen (Chang *et al.*, 1996; Strautnieks *et al.*, 1996).

1.3 Molekulare Zusammensetzung des ENaC

Der ENaC ist ein hetero-multimerer Komplex aus den drei Untereinheiten α, β und γ. Da der ENaC bisher nicht kristallisiert wurde, ist die Quartärstruktur des ENaC noch umstritten. Bis vor kurzem wurde entweder von der Stöchiometrie α₃β₃γ₃ oder α₂βγ ausgegangen (Anantharam & Palmer, 2007; Firsov *et al.*, 1998; Kosari *et al.*, 1998; Snyder *et al.*, 1998). Die jüngst durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärte Struktur des verwandten Ionenkanals

ASIC1 lieferte jedoch Grund zu der Annahme, dass auch ENaC als Trimer aus jeweils einer α -, β - und γ -Untereinheit aufgebaut ist ($\alpha\beta\gamma$) (Abb. 1. 3) (Bhalla & Hallows, 2008; Jasti *et al.*, 2007). Um die Notwendigkeit der ENaC-Kristallisierung zu umgehen und dennoch zur Aufklärung der Quartärstruktur des Kanals zu gelangen, könnte zukünftig als alternativer Ansatz die STED-Mikroskopie (*Stimulated Emission Depletion*) genutzt werden. Mit Hilfe dieser Variante der Konfokalmikroskopie kann die optische Auflösungsgrenze unterschritten werden. An biologischen Proben konnte auf diese Weise bereits eine Auflösungssteigerung bis auf 15 - 20 nm erreicht werden (Donnert *et al.*, 2006).

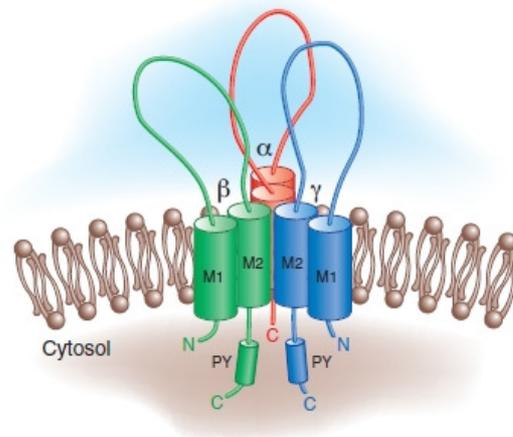


Abb. 1. 3: Schematische Struktur des epithelialen Na⁺-Kanals ENaC. Nach der Aufklärung der Struktur des verwandten Ionenkanals ASIC1 wird eine Trimer-Struktur des ENaC angenommen ($\alpha\beta\gamma$). Jede Untereinheit besitzt zwei Transmembrandomänen M1 und M2 mit intrazellulären N- und C-Termini (nach: Bhalla & Hallows, 2008).

Versuche an *Xenopus*-Oocyten demonstrierten, dass allein aus α -Untereinheiten zusammengesetzte ENaC-Kanäle einen Amilorid-sensitiven Na⁺-Transport von sehr geringem Ausmaß vermitteln. Werden jeweils β - oder γ -ENaC allein exprimiert, ist kein Na⁺-Transport nachweisbar. Eine maximale Transportrate wird hingegen erreicht, wenn sich Kanäle aus allen drei Untereinheiten in der apikalen Membran befinden (Canessa *et al.*, 1994). Dies erklärt sich auch aus der Tatsache, dass ein effizienter Einbau in die apikale Membran nur für Kanäle aus α -, β - und γ -Untereinheit gezeigt werden konnte (Firsov *et al.*, 1996).

Die humanen ENaC-Untereinheiten haben eine Aminosäuresequenzlänge von 649, 640 und 669 für α , β und γ , welche untereinander eine Sequenzhomologie von 30-40% aufweisen. Ihr Molekulargewicht liegt aufgrund von zusätzlicher Glycosylierung bei 85-95 kDa. Jede der ENaC-Untereinheiten besitzt zwei hydrophobe Transmembrandomänen. C- und N-Terminus liegen jeweils auf der cytosolischen Seite, während sich extrazellulär ein Loop von ~50 kDa befindet (Bhalla & Hallows, 2008). Weiterhin zeichnen sich alle ENaC-Untereinheiten durch eine konservierte Prolin-reiche Sequenz (PY-Motiv: PPPXYXXL) im cytoplasmatischen C-

Terminus aus, welche durch die Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit der Ubiquitinierung und der Endocytose des Proteins in Zusammenhang steht (Schild *et al.*, 1996; Staub *et al.*, 1996). Charakteristische Aminosäurereste im Bereich unmittelbar vor der beschriebenen Transmembrandomäne M2 sind essentiell für die Vermittlung der ausgesprochen hohen Na⁺-Selektivität des Kanals. Mit Ausnahme von Lithium (Li⁺) und Protonen (H⁺) gelangt kein anderes Kation durch den Kanal (Alvarez de la Rosa *et al.*, 2000). Daher wurde auf eine Ionenpore geschlossen, die von den Transmembrandomänen M2 aller drei Untereinheiten umgeben wird. Ähnlich dem Selektivitätsfilter des K⁺-Kanals zeigt beim ENaC das Peptidrückgrat in M2 in Richtung der Pore. Der Selektivitätsfilter wird dabei von Carbonylgruppen desselben ausgebildet (Noskov *et al.*, 2004). Wenige Aminosäuren vor dem beschriebenen Selektivitätsfilter findet sich die Bindestelle für den ENaC-Kanalblocker Amilorid. ENaC ist durch submicromolare Dosen von Amilorid bei einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von 100 nM hemmbar (Kellenberger und Schild, 2002). Therapeutisch wird Amilorid bei der Behandlung von Bluthochdruck und bei Kaliummangel als kaliumsparendes Diuretikum eingesetzt (Teiwes & Toto, 2007).

1.4 Transkriptionelle Regulation des ENaC

Die Transportaktivität des ENaC wird hauptsächlich durch die Anzahl der Kanäle in der apikalen Membran reguliert. Die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Regulation sind einerseits die Induktion der Genexpression der ENaC-Untereinheiten und andererseits die Beeinflussung des apikalen Targetings und der Aufenthaltsdauer des Kanals in der Membran.

Um zunächst auf die transkriptionelle Induktion einzugehen, wird im Folgenden die genomische Organisation des ENaC näher beschrieben. Während sich das Gen der humanen ENaC-Untereinheit α (*SCNN1A*) separat auf Chromosom 12p13 befindet, liegen *SCNN1B* und *SCNN1G*, die für β - und γ -ENaC auf Chromosom 16p12 codieren, in sehr enger Nachbarschaft (Entfernung 400 kb) und sind vermutlich durch Genduplikation entstanden (Voilley *et al.*, 1995). Alle drei weisen 13 Exons und einen hohen Grad an Konservierung ihrer genomischen Organisation auf.

Abhängig vom Gewebetyp werden die drei Untereinheiten transkriptionell auf verschiedene Weise reguliert. Im distalen Colon wird die Expression von β - und γ -ENaC durch Mineralocorticoide und Glucocorticoide induziert, während α -ENaC konstitutiv exprimiert wird (Asher *et al.*, 1996; Epple *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu ist es in der Niere gerade die α -Untereinheit, deren Transkription verstärkt wird (Abb.1. 4).

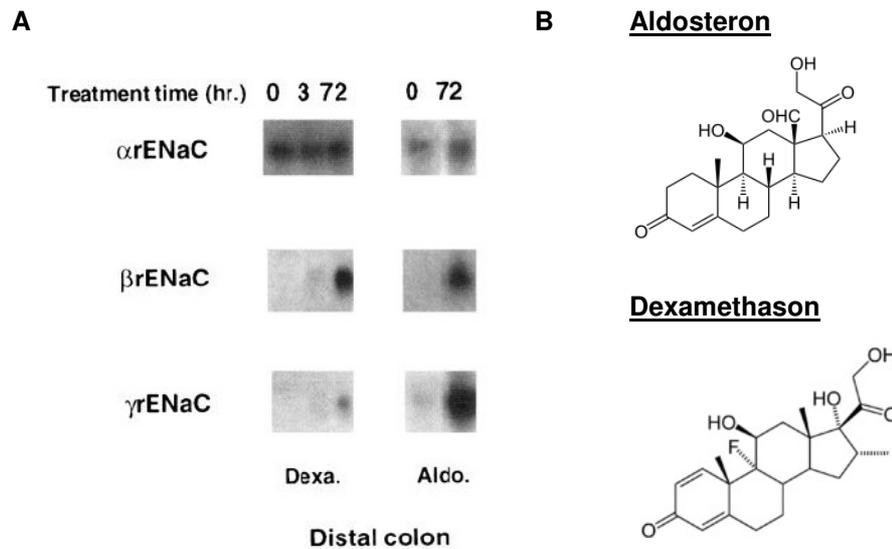


Abb. 1. 4: Regulation der ENaC-Untereinheiten durch Corticosteroide im distalen Colon der Ratte. (A) Northern Blot-Analyse der ENaC-Untereinheiten α , β und γ im distalem Colon der Ratte nach Injektion von Dexamethason bzw. Aldosteron (nach: Asher *et al.*, 1996). (B) Strukturformeln von Aldosteron und Dexamethason.

In den untersuchten Promoterregionen von β - und γ -ENaC wurden Zielregionen für die Bindung aktivierter Corticosteroidrezeptoren (*Hormone Response Elements*, HRE) gefunden. Diese sind jedoch, wie mittels Reporteragen-Analyse nachgewiesen worden ist, nicht funktionell aktiv (Auerbach *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2002). Aufgrund der engen Nachbarschaft und der Beobachtung der koordinierten Regulation von β - und γ -ENaC in vielen Geweben wird daher ein gemeinsames HRE als *cis*-Kontrollelement angenommen, das sich in Bezug auf die beiden Gene in einem weiter entfernten Bereich befindet (Thomas *et al.*, 2002). Auch die kurzkettige Fettsäure Butyrat induziert im Colon die Transkription der ENaC-Untereinheiten β und γ (Zeissig *et al.*, 2007). Dieses Phänomen wird in Abschnitt 1. 4. 2 näher beschrieben.

1. 4. 1 Regulation durch Corticosteroidrezeptoren

Die Wirkung von Mineralocorticoidhormonen (MC) und Glucocorticoiden (GC) auf die Transkription der ENaC-Untereinheiten wird durch die Aktivierung von Mineralocorticoid- bzw. Glucocorticoidrezeptor vermittelt. Diese beiden Rezeptorproteine zählen zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren, die als Liganden-induzierte Transkriptionsfaktoren fungieren (Abb. 1. 5).

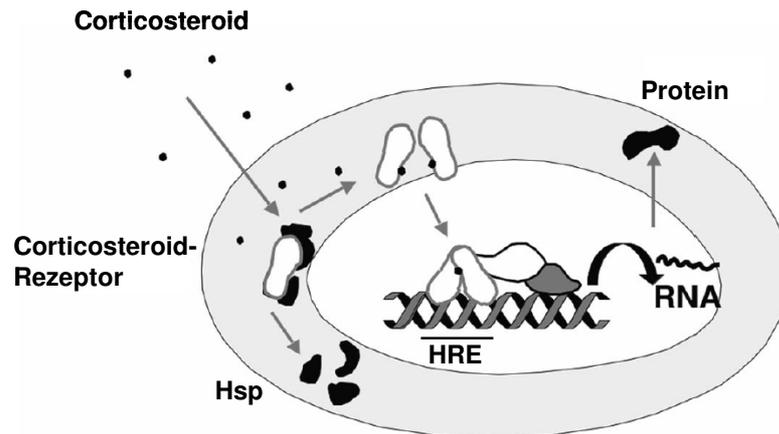


Abb. 1. 5: Schema der Corticosteroidrezeptor-vermittelten Signaltransduktion. Im inaktiven Zustand befinden sich die Rezeptoren gebunden an Chaperone bzw. *Heat Shock*-Proteine (Hsp) im Cytosol. Nach Diffusion des lipophilen Liganden durch die Zellmembran bindet dieser die Liganden-Bindedomäne (LBD) des Rezeptors. Daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung, Dissoziation der Chaperone und Freilegung der nukleären Lokalisationssequenz (NLS). Nach Translokation in den Kern und Dimerisierung kann der Rezeptor dort die Transaktivierung seiner Zielgene induzieren (modifiziert nach: Wikström, 2003).

Ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren üben Corticosteroidrezeptoren durch die Bindung an die entsprechenden *Hormone Response Elements* (HREs) auf der DNA aus. HREs stellen sequenzspezifische Erkennungselemente für den Rezeptor dar, bei denen es sich um Palindrome aus zwei Hexameren mit der Konsensus-Sequenz AGRACA NNN TGTYCT (R: G/A; Y: C/T) handelt. Diese können sich dabei bis zu 10 kb entfernt auf- oder abwärts gelegen vom Transkriptionsstart befinden (Wikström, 2003). Die DNA-Bindung erfolgt über die in der DNA-Bindedomäne (DBD) befindlichen zwei Zink-Finger. Über die Interaktion mit einer Reihe von Koaktivatoren und der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie kommt es letztendlich zur Beeinflussung der Transkription bestimmter Zielgene. Dabei ist sowohl eine Induktion und eine Repression der regulierten Gene möglich. Weiterhin kann eine transkriptionelle Modulation durch Corticosteroidrezeptoren durch *cross-talk* mit anderen spezifischen Transkriptionsfaktoren erreicht werden (Schoneveld *et al.*, 2004).

(I) Der Mineralocorticoidrezeptor

Für den humanen Mineralocorticoidrezeptor (MR) kodiert das Gen *NR3C2*. Der MR weist eine Größe von ~107 kDa (984 Aminosäuren) auf und wird vor allem in polarisierten Epithelien mit Aldosteron-abhängigem Na^+ -Transport exprimiert (Lombes *et al.*, 1984; Lombes *et al.*, 1990; Viengchareun *et al.*, 2007). In der Mukosa des distalen Colons zeigt sich eine zunehmende MR-Expression vom Grund der Lieberkühn-Krypten zu den Oberflächenepithelzellen hin. Das Ausmaß der Expression nimmt also mit dem Grad der Epitheldifferenzierung zu,

welche während der Wanderung der Colonepithelzellen entlang der Achse von den Krypten bis hin zur Oberfläche voranschreitet (Schulman *et al.*, 1994). In Abb. 1. 6 findet sich eine schematische Darstellung des Proteinaufbaus des MR.

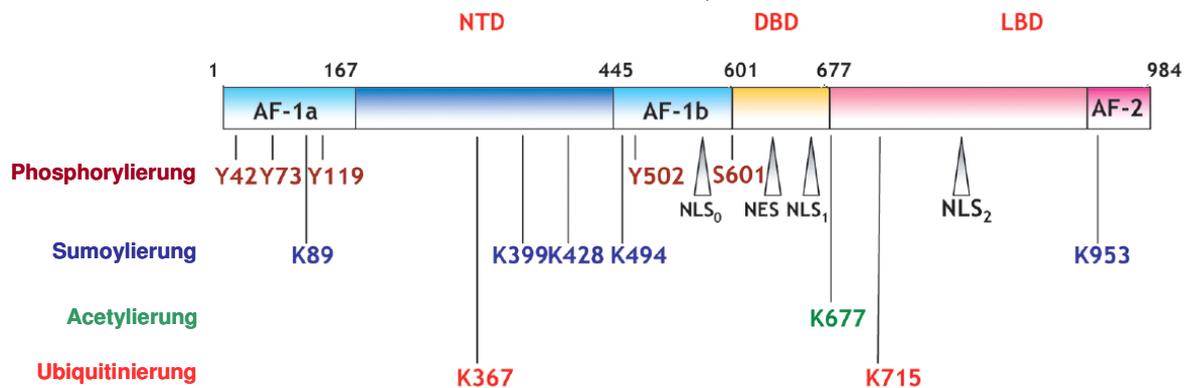


Abb. 1. 6: Schematischer Aufbau des humanen MR. Die N-terminale Domäne des Rezeptors enthält zwei *activating functions* (AF-1a und AF-1b), die zur Transaktivierung beitragen. Darauf folgt die DNA-bindende Domäne (DBD), an die sich eine Gelenkregion (*hinge*) und dann die Liganden-bindende Domäne (LBD) anschließen. Innerhalb der LBD findet sich eine ligandenabhängige aktivierende Domäne (AF-2) (modifiziert nach: Viengchareun *et al.*, 2007).

Im Zusammenhang mit dem transepithelialen Na⁺-Transport steht der MR als Hormonrezeptor am Ende der RAAS-Kaskade. Die ENaC-Untereinheiten selbst sind dabei nicht die einzigen Gene, die einer Transaktivierung durch den MR unterliegen. Für andere beteiligte Gene wurde ebenfalls eine Induktion durch MR-abhängige Transaktivierung nachgewiesen (siehe Tab.1. 1).

Tab. 1. 1: Zielgene des MR in epithelialen Geweben und ihre biologischen Funktionen.

Gen	Gewebetyp	Funktion	Referenz
α-ENaC	Niere	Na ⁺ -Transport	(Masilamani <i>et al.</i> , 1999)
β- und γ-ENaC	Colon	Na ⁺ -Transport	(Epple <i>et al.</i> , 2000)
α1/β1Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Colon, Niere	Na ⁺ -Export und K ⁺ -Import über basolaterale Membran	(Kolla & Litwack, 2000b)
SGK-1	Colon, Niere	Na ⁺ -Transport, Reduktion von ENaC-Ubiquitinierung	(Debonneville <i>et al.</i> , 2001)
GILZ	Colon, Niere	Na ⁺ -Transport, Reduktion von ENaC-Ubiquitinierung	(Soundararajan <i>et al.</i> , 2005) (Bergann <i>et al.</i> , 2009a)
K-Ras	Colon	Na ⁺ -Transport, Aktivierung von SGK-1 über PI3K	(Brennan & Fuller, 2006) (Staruschenko <i>et al.</i> , 2005)
Usp2-45	Colon, Niere	Na ⁺ -Transport, ENaC-Deubiquitinierung	(Fakitsas <i>et al.</i> , 2007)
WNK1	Niere	Na ⁺ -Transport, Aktivierung von SGK-1	(Naray-Fejes-Toth <i>et al.</i> , 2004; Xu <i>et al.</i> , 2005)

CHIF	Colon, Niere	Regulation der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	(Beguin <i>et al.</i> , 2001)
ROMK	Niere	K ⁺ -Kanal für K ⁺ -Sekretion über die apikale Membran	(Beesley <i>et al.</i> , 1998)
BK-Kanäle	Colon	K ⁺ -Kanal für K ⁺ -Sekretion über die apikale Membran	(Sorensen <i>et al.</i> , 2008)

Darunter befinden sich zahlreiche Faktoren, die an der Regulation der ENaC-Ubiquitinierung beteiligt sind, was die Menge der apikal lokalisierten ENaC-Moleküle beeinflusst. Zusätzlich werden neben dem Na⁺-Transport auch die K⁺-Sekretion über die Na⁺/K⁺-ATPase und die in der apikalen Membran exprimierten Kaliumkanäle stimuliert.

Corticosteroidrezeptoren unterliegen einer Vielzahl post-translationaler Modifikationen. Bislang wurde für den MR neben der Phosphorylierung auch eine Sumoylierung nachgewiesen (Odermatt & Atanasov, 2009). Dabei wird über einen Lysinrest das Zielmolekül mit dem 11 kDa Protein SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) verknüpft. Im Falle des MR führte seine Sumoylierung zu einer Repression der Funktion. Weiterhin kann der MR ubiquitiniert werden, wodurch ein Targeting des Rezeptors zum Proteasom eingeleitet wird. Die physiologische Relevanz dieser Beobachtungen für den MR muss allerdings noch näher charakterisiert werden. Da der MR auch durch Glucocorticoide aktivierbar ist, werden in den MR-exprimierenden Geweben vorhandene Glucocorticoide durch das Enzym 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD-2) inaktiviert. 11 β -HSD-2 katalysiert die Umwandlung von Cortisol zu Cortison, das den MR nicht aktivieren kann (Funder, 2005).

(II) Der Glucocorticoidrezeptor

Glucocorticoide (GC) werden im Körper auf Stress-Stimuli hin in der Nebennierenrinde synthetisiert und wirken sich systemisch in verschiedenster Weise aus. So wurden GC-vermittelte Effekte im Hinblick u.a. auf Entwicklung, Wachstum, neurobiologische Prozesse oder Apoptose beobachtet. Je nach untersuchtem Zelltyp liegt die Zahl der durch GC regulierten Gene im Bereich von Hunderten bis Tausenden (Lu & Cidlowski, 2006). Bezogen auf die therapeutische Anwendung zählen GC zu den meistverschriebenen Medikamenten und werden aufgrund ihrer immunsuppressiven und anti-inflammatorischen Wirkung bei der Therapie von Asthma, rheumatoider Arthritis oder auch bei Autoimmun- und chronisch entzündlichen Erkrankungen eingesetzt. Der ubiquitär exprimierte Rezeptor für GC ist der humane Glucocorticoidrezeptor, welcher vom Gen *NR3C1* kodiert wird (Schäcke *et al.*, 2007). Es existieren verschiedene GR-Isoformen, die sich zum einen am C-Terminus aufgrund der Existenz zweier alternativer Exons (9 α und β) unterscheiden und als GR- α und - β bezeichnet werden (Abb. 1. 7). Dabei repräsentiert GR- α den klassischen hormonabhängigen Rezeptor, während GR- β keine Glucocorticoide bindet, sondern durch

Heterodimerisierung oder Konkurrenz um GRE- oder Koaktivatorbindung dominant negative Effekte ausübt (Oakley *et al.*, 1999; Yudit & Cidlowski, 2002). Als Folge verschiedener Translationsstartpunkte existieren weiterhin zusätzlich mehrere kürzere Isoformen des GR. Der klassische GR- α -A hat eine Proteingröße von ~94 kDa und eine Aminosäurezahl von 777 (Chrousos & Kino, 2005).

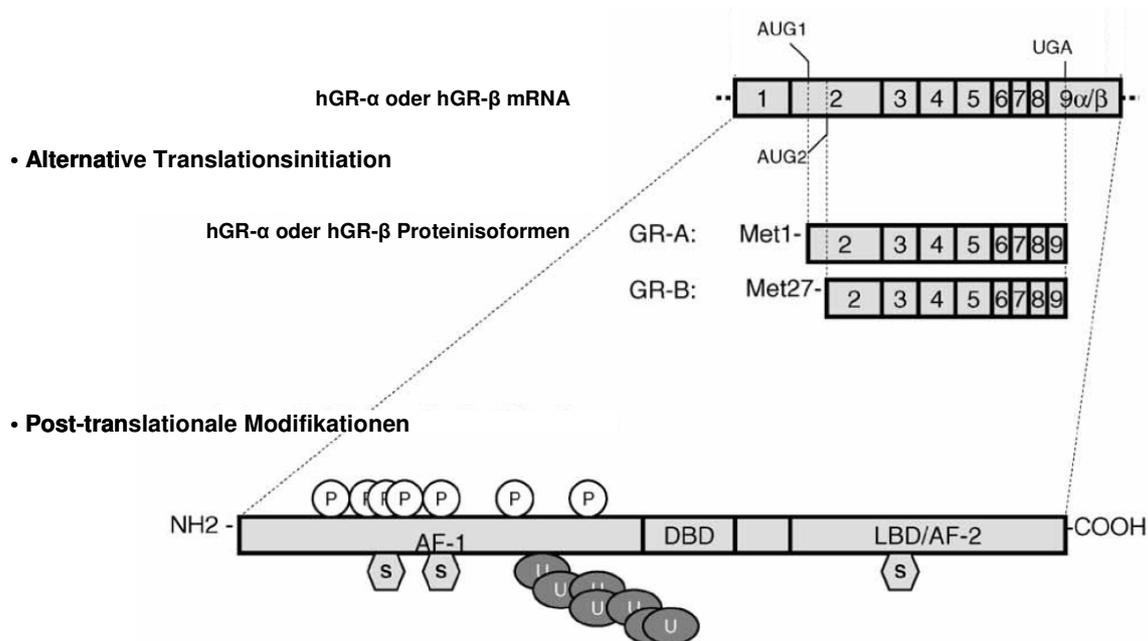


Abb. 1. 7: Genomische Struktur und Proteinaufbau des humanen GR. Aufgrund alternativen Splicings entstehen die zwei Isoformen GR- α und β . Durch Verwendung verschiedener Translationsinitiationsstellen werden die Isoformen GR-A, -B, -C und -D generiert. Auch der GR weist in der N-terminalen Domäne (NTD) eine AF-1 auf, sowie die DNA-bindende Domäne (DBD) und eine Liganden-bindende Domäne (LBD) mit ligandenabhängiger AF-2. Der GR wird an verschiedenen Positionen phosphoryliert (P), sumoyliert (S) und ubiquitiniert (U) (modifiziert nach: Zhou & Cidlowski, 2005).

MR und GR weisen im Hinblick auf ihre DNA-bindende Domäne (DBD) eine Homologie von 94% auf (Pippal & Fuller, 2008). Aus diesem Grund sind beide Rezeptoren imstande, an die identischen DNA-Konsensus-Sequenzen zu binden. Dennoch existiert eine differentielle Regulation durch beide Rezeptoren. Indem sie mit unterschiedlichen Koaktivatoren interagieren, können sie jeweils die Expression verschiedener Sets von Genen beeinflussen. Post-translationale Modifikationen des GR sind besser charakterisiert als die des MR. In der N-terminalen Domäne des GR wurden konstitutiv phosphorylierte Aminosäuren sowie Liganden-induzierte oder Zellzyklus-abhängige Phosphorylierungen nachgewiesen. Bei der Analyse der funktionellen Relevanz der Liganden-induzierten Phosphorylierungen zeigte sich, dass die Phosphorylierung an Position Ser211 mit der Transaktivierungskapazität korrelierte (Wang *et al.*, 2002). Als GR-phosphorylierende Kinasen wurden neben MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinase*) auch Zellzyklus-abhängige Kinasen (CDKs) und GSK-3 (*glyco-*

gen synthase kinase-3) postuliert (Duma *et al.*, 2006). Weiterhin wird der GR an der Position Lys426 ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut (Wallace & Cidlowski, 2001). Außerdem wurde auch eine Sumoylierung des Proteins nachgewiesen (Tian *et al.*, 2002). Für den GR ist im Unterschied zum MR das *cross-talk* mit anderen Transkriptionsfaktoren gut charakterisiert. So ist in Bezug auf die anti-inflammatorische Wirkung der GC vielfach beschrieben, dass die Glucocorticoid-Signaltransduktion und die von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α (Tumor Nekrose Faktor- α) abhängigen Signaltransduktionswege wechselseitig antagonistisch reguliert sind. Der GR kann dabei die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 durch Bindung inhibieren, wodurch die Induktion immunregulatorischer Gene wie z.B. von Zytokinen und deren Rezeptoren oder von Adhäsionsmolekülen auf pro-inflammatorische Stimuli hin verhindert wird (Almawi & Melemedjian, 2002; Heck *et al.*, 1994; McKay & Cidlowski, 1998; Smoak & Cidlowski, 2004). Im Gegensatz dazu existieren auch Beobachtungen von kooperativen Effekten des GR mit anderen Transkriptionsfaktoren. So verläuft die Wechselwirkung der Signaltransduktion über STATs (*signal transducer and activator of transcription*) mit dem GR zumeist in synergistischer Weise (Rogatsky & Ivashkiv, 2006).

Bezogen auf intestinale Ionentransportprozesse existiert die mehrere Jahrzehnte alte Beobachtung, dass GC auch mineralocorticoide Wirkung aufweisen. Sie können die Resorption von Na⁺ steigern und auch die Ausscheidung von K⁺, Ca²⁺ und H⁺ (Charney *et al.*, 1975; Meeneely & Ghishan, 1982). Der aktivierte GR ist im Hinblick auf den elektrogenen Na⁺-Transport im distalen Colon in der Lage, die Expression einer Vielzahl der MR-induzierten Gene ebenfalls zu stimulieren, wie z.B. der ENaC-Untereinheiten β und γ (Asher *et al.*, 1996). Aber auch die Expression der am apikalen Targeting des ENaC beteiligten Proteine SGK-1 und GILZ sowie der Aktivität der basolateralen Na⁺/K⁺-ATPase werden im distalen Colon durch GC induziert (Sandle, 1991; van der Laan *et al.*, 2008). Neben dem elektrogenen Na⁺-transport wird auch der elektroneutrale Na⁺-Transport durch GC gesteigert, indem die NHE3-Aktivität sowohl transkriptionell als auch SGK-abhängig induziert wird (Yun *et al.*, 2002).

1. 4. 2 Regulation durch Butyrat

Neben der hormonellen Induktion der Transkription von ENaC-Untereinheiten existiert im Colon eine Regulation durch bakterielle Abbauprodukte. Die kurzkettige Fettsäure Butyrat wird im Colon durch die Fermentierung pflanzlicher Kohlenhydrate durch anaerobe Bakterien gebildet (Scheppach & Weiler, 2004). Butyrat dient dabei einerseits als Hauptenergiequelle der Colonozyten, ist aber auch an der Regulation von Zellproliferation und -differenzierung beteiligt und weist weiterhin anti-inflammatorische sowie anti-tumorale Wirkung auf. Die Expression von etwa 5% aller Gene unterliegt einer Regulation durch Butyrat, wobei der

vorrangig zugrunde liegende Mechanismus in einer Inhibition von Histondeacetylasen durch Butyrat besteht (Hamer *et al.*, 2008).

Die genannte anti-inflammatorischen Wirkung des Butyrat wird über die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermittelt (Segain *et al.*, 2000). Im Colon hat Butyrat weiterhin eine essentielle Rolle bei der Zelldifferenzierung, da es an der Ausbildung des Bürstensaums oder auch der Induktion der 11 β -HSD-2-Expression beteiligt ist. Auch epitheliale Transportvorgänge werden im Colon durch Butyrat beeinflusst. So induziert Butyrat sowohl den elektroneutralen als auch den elektrogenen Natriumtransport (Vidyasagar & Ramakrishna, 2002; Zeissig *et al.*, 2007). Bei beiden Transportarten kommt die Induktion durch eine gesteigerte Promoteraktivität der jeweiligen Gene (NHE3 bzw. ENaC-Untereinheiten) zustande. Für den elektrogenen Natriumtransport wurde gezeigt, dass eine verstärkte Bindung des Transkriptionsfaktors Sp3 an den γ -ENaC-Promoter eine erhöhte Expression dieser Untereinheit nach sich zog (Zeissig *et al.*, 2007). Allerdings konnten ein signifikanter ENaC-vermittelter Natriumtransport sowie apikal lokalisierte ENaC-Moleküle nur nach simultaner Inkubation mit Butyrat und Corticosteroiden beobachtet werden. Während Butyrat die Gesamtzahl an im Cytoplasma vorhandenen ENaC-Molekülen erhöhte, war die Präsenz von Corticosteroiden essentiell für das apikale Targeting der Kanäle. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen für diese Beobachtung hinsichtlich des Zusammenspiels von Butyrat und Corticosteroiden bei der ENaC-Induktion blieben bislang ungeklärt.

1.5 Regulation des ENaC-Targetings

Während sich die bisher beschriebene transkriptionelle Regulation auf die Gesamtverfügbarkeit von ENaC-Molekülen auswirkt, wird der ENaC zusätzlich im Hinblick auf seine Transportaktivität in der apikalen Membran reguliert. Dies geschieht hauptsächlich durch die Veränderung der Kanalanzahl in der apikalen Membran. Hier kommt die Bilanz zwischen Kanalsynthese bzw. Zuführung in die apikale Membran und dem Wiedereinschleusen ins Zellinnere zum Tragen. Eine Regulation der Kanalaktivität wird auf diese Weise durch eine kurze Halbwertszeit der apikalen Lokalisation des ENaC ermöglicht, die bei 20 bis 30 min liegt (Butterworth *et al.*, 2009). Regulatorische Angriffspunkte stellen hier die Steigerung der Synthese von Kanaluntereinheiten und deren Einbau in die Membran sowie auch eine Verminderung der Endocytoserate bzw. der Degradationsrate des Kanals dar.

Während die Steigerung der mRNA-Expression der ENaC-Untereinheiten selbst als „späte“ Phase der Aldosteron-induzierten ENaC-Regulation bezeichnet wird, werden die schneller einsetzenden Regulationsprozesse auf dem Proteinlevel des Kanals als „frühe“ Regulationsphase aufgefasst. Dazu zählt die Expressionsregulation von Komponenten, die eine gesteigerte apikale ENaC-Lokalisation hervorrufen. Dies geschieht durch Regulation des Kreislaufs, bei dem die apikale ENaC-Expression durch die E3-Ubiquitinligase Nedd4-2

(*Neural precursor cell-expressed, developmentally downregulated gene 4*) vermindert wird (Goulet *et al.*, 1998). Nedd-4-2 bindet über seine WW-Domäne (Trp-Trp-Domäne) die schon beschriebenen Prolin-reichen PY-Motive im C-Terminus der ENaC-Untereinheiten. Im Folgenden kommt es zu einer Ubiquitinierung von Lys-Resten im N-Terminus von α - und γ -ENaC (Staub *et al.*, 1997). Das PY-Motiv des ENaC ist eingebettet in zwei Clathrin-vermittelte Endozytose-Motive (NPxY, YxxL). Das an die ENaC-Untereinheiten gebundene Ubiquitin interagiert seinerseits mit Epsin, das dann über Clathrin-Adaptermoleküle die Clathrin-vermittelte Endocytose des ENaC hervorruft (Wang *et al.*, 2006b). Internalisierte ENaC-Kanäle unterliegen entweder nach Deubiquitinierung einem Recycling zur Membran oder werden lysosomal degradiert. Auch auf der Ebene des Recyclings von ENaC-Kanälen setzt die Mineralocorticoid-abhängige Regulation an. So wurde die frühe Aldosteron-induzierte Ubiquitin-spezifische Protease Usp2-45 identifiziert, welche ENaC deubiquitiniert und so den ENaC-vermittelten Na^+ -Transport stimuliert (Fakitsas *et al.*, 2007).

Ein Überblick der an der Regulation des ENaC-Targetings beteiligten Mechanismen ist in Abb. 1. 8 dargestellt.

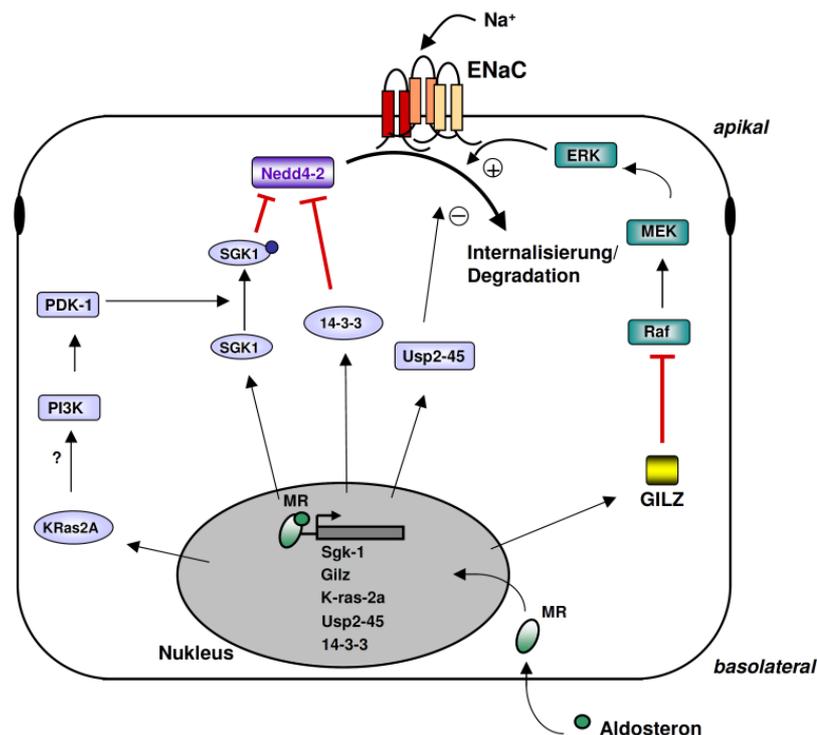


Abb. 1. 8: Schema der Aldosteron-induzierten Regulation des ENaC-Targetings. Aldosteron kann durch Aktivierung des MR die Transaktivierung von SGK-1, GILZ, K-Ras-2A, Usp2-45 und 14-3-3-Proteinen induzieren. Die dadurch aktivierten Signalwege resultieren in einer verminderten ENaC-Ubiquitinierung. In der Folge wird die ENaC-Internalisierung/Degradation reduziert.

1. 5. 1 Regulation durch SGK-1

Ein zentraler Faktor für die Aldosteron-abhängige Regulation dieser Internalisierungsprozesse ist die *Serum- and glucocorticoid-induced kinase-1* (SGK-1), die eng verwandt mit der Protein Kinase B / Akt ist. Die Expression von SGK-1 wird durch Mineralo- und Glucocorticoide induziert und wurde bereits für das distale Nephron und Colon nachgewiesen (Brennan & Fuller, 2000; Shigaev *et al.*, 2000). SGK-1 ist imstande, Nedd4-2 zu phosphorylieren und dadurch dessen ENaC-Bindung zu inhibieren (Debonneville *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2002). Nedd4-2 wird im phosphorylierten Zustand von spezifischen Aldosteron-induzierten Isoformen des Phosphoserin/-threonin-bindenden Gerüstproteins 14-3-3 gebunden (Bhalla *et al.*, 2005). So verbleiben unter Einfluss der aktiven SGK-1 ENaC-Kanäle vermehrt in der apikalen Membran, so dass der gesamte elektrogene Na⁺-Transport verstärkt wird. SGK-1 erhöht zusätzlich die Aktivität der basolateralen Na⁺/K⁺-ATPase.

SGK-1 selbst wird durch die PI3K-Kaskade (Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase) phosphoryliert und aktiviert. Wie die Aktivierung dieser Kaskade in Abhängigkeit von Aldosteron zustande kommt, ist jedoch noch umstritten (Blazer-Yost *et al.*, 1999). Eine Möglichkeit besteht in einem weiteren Aldosteron-abhängigen Gen. Das kleine G-Protein K-Ras2A wird im distalen Colon unter dem Einfluss von Gluco- und Mineralocorticoiden vermehrt exprimiert und steigert den ENaC-vermittelten Na⁺-Transport (Brennan & Fuller, 2006; Stockand *et al.*, 1999). Dies könnte durch die K-Ras-abhängige Aktivierung der PI3K hervorgerufen werden (Staruschenko *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2004). PI3K katalysiert die Phosphorylierung von PIP₂ zu PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat), das dann die PDK1 (*3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) aktiviert, welche ihrerseits SGK-1 zum Substrat hat (Kobayashi & Cohen, 1999; Park *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001).

1. 5. 2 Regulation durch GILZ

Die Phosphorylierung des ENaC selbst kann in gegensätzlicher Weise Auswirkungen auf die oben beschriebene Assoziation mit Nedd4-2 haben. In der Nähe des PY-Motivs gelegene Thr-Reste in β- und γ-ENaC werden durch die Aktivität der *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) phosphoryliert, wodurch die Bindung von Nedd4-2 erleichtert wird, so dass es zu einer verstärkten Internalisierung des ENaC kommt (Shi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2006). Auf dieser Ebene der Regulation kommt wiederum der frühe Einfluss des Aldosterons zum Tragen, da das Aldosteron-induzierte Protein GILZ (*glucocorticoid-induced leucine zipper*) einen „dis-inhibitorischen“ auf ENaC ausübt (Soundararajan *et al.*, 2007; Soundararajan *et al.*, 2005). Dieser kommt durch die Bindung von GILZ an die im Signalweg aufwärts von ERK1/2 gelegenen Signalmoleküle Ras und Raf und deren Hemmung zustande (Ayroldi *et al.*, 2007). Ursprünglich wurde GILZ als Glucocorticoid-induziertes Gen in T-Lymphocyten

entdeckt, das aufgrund seiner Leucin-Zipper-Struktur als potentieller Transkriptionsfaktor angesehen wurde (D'Adamio *et al.*, 1997). Später wurde für Nierenzellen auch eine mineralocorticoid-abhängige Expression von GILZ gezeigt sowie dessen starke stimulatorische Wirkung auf den ENaC-vermittelten Na⁺-Transport (Soundararajan *et al.*, 2005). Auch im Colon wurde eine Induktion von GILZ durch Glucocorticoide nachgewiesen (van der Laan *et al.*, 2008), allerdings liegen zur Aldosteron/MR-abhängigen Expression von GILZ im Colon noch keine Daten vor.

1.6 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Chronische entzündliche Darmerkrankungen (CED) stellen eine Gruppe entzündlicher Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes dar, deren Hauptvertreter Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (CU) sind. Beide Erkrankungen treten chronisch rezidivierend auf. Im Fall von MC kann der gesamte Gastrointestinaltrakt, meistens jedoch das terminale Ileum sowie das Colon betroffen sein, wobei sich segmental diskontinuierliche Entzündungsherde aller Darmwandschichten ausbilden. Die Colitis ulcerosa breitet sich hingegen vom Mastdarm her kontinuierlich aus und ist auf den Dickdarm begrenzt. Sie zeichnet sich durch Schwellungen und Ulcerationen der Schleimhaut (Mukosa) und Submukosa aus (Beattie *et al.*, 2006). In den westlichen Industriestaaten beträgt die Prävalenz ca. 150 an MC Erkrankte und 300 an CU Erkrankte auf 100.000 Einwohner, wobei das erste Auftreten von MC meist in einem Lebensalter von 20 bis 40 Jahren stattfindet und die CU im höheren Lebensalter auftritt (Jacobsen *et al.*, 2006). Akute Schübe von MC sind durch Diarrhoen, Schmerzen im Unterbauch, Fieber, Erbrechen und Gewichtsabnahme gekennzeichnet. Blutbeimengungen im Stuhl sind bei MC seltener als bei der CU.

Als Ursache der immunologischen Störung bei CED wird ein Zusammenspiel aus genetischen, bakteriellen, psychischen und umweltbedingten Faktoren angesehen, die zu einem erhöhten Niveau pro-inflammatorischer Zytokine und einer Barriestörung des befallenen Darmepithels führen (Owczarek *et al.*, 2009). Es wurde eine Vielzahl von Suszeptibilitätsgenen identifiziert, deren Mutation mit dem gehäuftem Auftreten von MC korrelierten (Xavier & Podolsky, 2007). Die Analyse der Funktionen dieser Gene unterstützt die Hypothese, dass sich der Auslöser von MC in einer fehlgeleiteten Immunantwort gegen die bakterielle Darmflora finden lässt. Ein Suszeptibilitätsgen bei MC ist beispielsweise *NOD2* (auch *CARD15*, *IBD1*), das vorrangig in intestinalen Epithelzellen sowie Paneth-Zellen und antigen-präsentierenden Zellen exprimiert wird. *NOD2* codiert für einen Rezeptor des Muramyl-Dipeptids des bakteriellen Peptidoglycans, der in Paneth-Zellen die Produktion von Defensinen anregt, welche der bakteriellen Abwehr dienen. Diese Defensin-Produktion ist in MC-Patienten geschwächt (Wehkamp *et al.*, 2004).

1. 6. 1 Rolle pro-inflammatorischer Zytokine bei CED

Ursächlich für die Ausbildung chronisch inflammatorischer Prozesse bei CED ist die exzessive Produktion von T_H1 - bzw. T_H2 -Zytokinen, die aufgrund der fehlgesteuerten intestinalen Immunreaktion zustande kommt. Während erhöhte Spiegel der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 bei MC und CU nachgewiesen werden konnten, zeichnete sich MC darüber hinaus durch ein erhöhtes IFN- γ - und IL-12-Niveau und CU durch das Vorhandensein von IL-5 und IL-13 aus (Heller *et al.*, 2005; Papadakis & Targan, 2000; Stallmach *et al.*, 2004; Xavier & Podolsky, 2007). Vor allem für MC wurde das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α als zentraler Faktor identifiziert. In Übereinstimmung damit wurde ein signifikanter Erfolg von Anti-TNF- α -Antikörper-Therapien (z.B. von Infliximab/Remicade®) beobachtet (Targan *et al.*, 1997). TNF- α stellt den Prototyp eines pro-inflammatorischen Zytokins dar, dessen lösliche Form vorrangig aus Makrophagen, Monocyten und aktivierten T-Lymphocyten als Trimer von 51 kDa freigesetzt wird. Für TNF- α existieren die zwei Rezeptoren TNF-Rezeptor-1 (p55/60) und -2 (p75/80) (TNF-R1/2), welche eine herausragende Rolle bei der Steuerung immunregulatorischer Prozesse spielen. Beide können über die Aktivierung von TRAF-2 (*TNF receptor associated factor-2*) den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren. NF- κ B induziert die Genexpression einer Vielzahl von an Entzündungsprozessen beteiligter Faktoren, dazu zählen die Prostaglandinsynthase Cyclooxygenase-2 (COX-2), die Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-2 sowie verschiedene Adhäsionsmoleküle (ICAMs, VCAMs). Es wird davon ausgegangen, dass NF- κ B bei CED einer chronischen Aktivierung unterliegt (Xavier & Podolsky, 2007). Weiterhin werden durch TNF- α verschiedene MAP-Kinase-Signalwege (*mitogen activated protein kinase*) aktiviert (Aggarwal, 2003). Zu diesen zählen einerseits die klassischen MAP-Kinasen ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinase*), die bezüglich der Zellproliferation, -differenzierung und der postmitotischen Funktionen differenzierter Zellen eine Rolle spielen. Weiter wird über TNF- α die MAP-Kinase p38 aktiviert, die in die Immunantwort und Entzündungsprozesse, aber auch in Differenzierungsprozesse involviert sein kann (Kyriakis und Avruch, 2001). Auch wird die JNK (c-Jun N-terminale Kinase) aktiviert, welche bei Entzündungsvorgängen die Zytokinproduktion (z.B. von IL-8) induzieren kann (Roux & Blenis, 2004).

Bei CED kommt es aufgrund der gesteigerten inflammatorischen Aktivität und der erhöhten Zytokinpräsenz zu einer Barrierestörung in den betroffenen Darmarealen. Zugrunde liegen dabei eine gesteigerte Apoptose-Rate epithelialer Zellen und eine Schädigung der interzellulären Tight Junctions (Schlussleisten), die im intestinalen Epithel den parazellulären Transport limitieren (Gitter *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 1999; Zeissig *et al.*, 2004). So konnte gezeigt werden, dass es bei CED zur Reduktion abdichtender Tight Junction-Proteine (Claudin-5 und -8) und zur Induktion porenbildender Claudine kommt und dass TNF- α und

IL-13 - ein wichtiges Zytokin der CU - ausschlaggebend für diese Effekte waren (Heller *et al.*, 2005; Mankertz *et al.*, 2009; Mazzon & Cuzzocrea, 2008). Die Schwächung der intestinalen Barriere ermöglicht die verstärkte Aufnahme von luminalen Noxen, die ihrerseits wiederum Entzündungsprozesse auslösen können. Darüber hinaus werden dadurch auch vermehrt passiv Solute und Wasser abgegeben, so dass sich eine Leckflux-Diarrhoe ausbildet. Auf diese Weise tragen diese Barriere-defekte auch zur Diarrhoe bei CED bei.

Therapeutisch werden bei CED zunächst 5-Aminosalicylsäurepräparate (Mesalazin) eingesetzt, die als Lipoxygenase-Hemmer entzündungshemmend wirken (Hemmung der Leukotriensynthese, Senkung des Spiegels pro-inflammatorischer Zytokine) (Büning & Lochs, 2006). Die Anwendung von Glucocorticoiden ist trotz der damit verbundenen Nebenwirkungen eine häufige Therapieform bei CED. Mit ihrer Hilfe kann wie beschrieben u. a. die Aktivität pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B GR-abhängig gehemmt werden. Weiterhin werden Anti-TNF- α -Antikörper (Infliximab/Remicade[®]), Butyrat-Spülungen oder auch immunsuppressive Zytostatika (Azathioprin/Imurek[®]) verabreicht.

1.7 ENaC-Dysregulation bei CED

Bei CED wird neben der Barrierefunktion auch der epitheliale Transport des Darms gestört, wobei generell gesteigerte Sekretionsvorgänge sowie eine reduzierte Resorption beobachtet werden. Während eine aktive Ionensekretion als relevante Diarrhoe-Komponente zumindest bei mittelschwerer bis schwerer Entzündungsaktivität ausgeschlossen werden konnte, wurde bei CED eine verminderte Wasser- und Salzresorption bei CED als ursächlich identifiziert (Martinez-Augustin *et al.*, 2009). Von dieser Verminderung sind sowohl der elektroneutrale als auch der elektrogene Natriumtransport betroffen. So zeigte sich, dass in Biopsiegewebe von CED-Patienten sowohl die Gesamt-Na⁺-Resorption als auch der Kurzschlussstrom und der elektrogene ENaC-vermittelte Na⁺-Transport gegenüber Kontrollproben verringert waren (Hawker *et al.*, 1980; Sandle *et al.*, 1986; Sandle *et al.*, 1990). Dies ist exemplarisch für den Amilorid-sensitiven, ENaC-vermittelten Kurzschlussstrom einer Gruppe zusammengesetzt aus 17 MC- und UC-Patienten aus der Studie von Sandle *et al.* dargestellt (Tab. 1.1).

Tabelle 1. 1 : Vergleich des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms zwischen nicht entzündetem distalem Colon und distalem CED-Colon.

Gewebe (Distales Colon)	I _{SC} (μA/cm ²)	Anzahl n
nicht entzündet (Kontrollgewebe)		14
basal	143 ± 23	
plus Amilorid	23 ± 14	
entzündet (CED-Patienten)		17
basal	51 ± 12*	
plus Amilorid	16 ± 6	

Der Kurzschlussstrom von Biopsieproben humanen distalen Colons wurde vor und nach Amiloridgabe (0,1 mM) charakterisiert. *p<0,02 verglichen mit dem basalen Kurzschlussstrom der nicht entzündeten Proben (Sandle *et al.*, 1990).

Grund dafür war die reduzierte Expression der ENaC-Untereinheiten β und γ, die von einer verminderten Aktivität der basolateralen Na⁺/K⁺-ATPase begleitet war (Greig & Sandle, 2000; Greig *et al.*, 2004; Sandle *et al.*, 1990). Somit scheinen unter den entzündlichen Bedingungen der CED die kompensatorischen Mechanismen, sie sonst im Falle von Elektrolytverlust und Diarrhoe einsetzen, außer Kraft gesetzt zu sein.

Studien zu den für die Herabregulation des ENaC bei CED verantwortlichen Faktoren zeigten die entscheidende Rolle verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine in diesem Zusammenhang auf. Im *ex vivo*-Versuch konnte an Gewebeproben von MC- und CU-Patienten eine Störung des Aldosteron-induzierten ENaC-vermittelten Na⁺-Transports und der Expression der ENaC-Untereinheiten β und γ gezeigt werden. In beiden Fällen wurde eine ausschlaggebende Rolle des Zytokins TNF-α nachgewiesen (Amasheh *et al.*, 2004; Zeissig *et al.*, 2008). Ähnlich wirkte sich auch die Präsenz des ebenfalls bei CED erhöhten Zytokins IL-1β aus, während IFN-γ keinen vergleichbaren Effekt aufweist (Barmeyer *et al.*, 2004a). Dennoch blieben die detaillierten Mechanismen, durch welche pro-inflammatorische Zytokine die Mineralocorticoid-vermittelte Induktion des ENaC verhindern, bislang überwiegend ungeklärt. Die Charakterisierung der Promotorbereiche von β- und γ-ENaC identifizierte für beide Gene Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1/Sp3 und AP-2 sowie die Anwesenheit von GRE-Sequenzen. Es konnte aber ausschließlich für Sp3 tatsächlich eine Bindung nachgewiesen werden und zwar am γ-ENaC-Promotor. Es wurde bislang keine Bindung von Transkriptionsfaktoren, die über pro-inflammatorische Zytokine aktiviert werden, festgestellt. Da allgemein von einem weiter entfernten regulatorischen *cis*-Element ausgegangen wird, über das die Mineralocorticoide ihre Wirkung entfalten können, ist auch anzunehmen, dass über diesen regulatorischen Weg eine Interferenz mit einem Zytokin-abhängigen inhibitorischen Signal zustande kommen könnte (Auerbach *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2002).

Die Inhibition des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports bei CED kann bei der therapeutischen Anwendung von Glucocorticoiden durch deren bereits beschriebene mineralocorticoide

Wirkung überwunden werden. So zeigte sich, dass nach Verabreichung von Glucocorticoidpräparaten eine sehr rasche Verbesserung der Diarrhoe-Symptomatik bei CED-Patienten auftritt. Anhand von Ergebnissen rektaler Transportmessungen mittels Dialyse-Technik bei Patienten mit CU konnte diese Beobachtung auf einen signifikanten Anstieg der Na⁺- und Wasserresorption auf Normalniveau bereits 5 h nach intravenöser Verabreichung von GC (Hydrocortison-Hemisuccinat, 100 mg oder Methylprednisolon, 40 mg) zurückgeführt werden (Hawker *et al.*, 1980; Sandle *et al.*, 1986). Es zeigte sich nach Hydrocortisongabe ein Anstieg der basalen Netto-Natriumresorption von $0,1 \pm 0,5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ auf einen Wert von $2,6 \pm 0,8 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ ($p < 0,02$), der sich im Bereich der Transportraten gesunden Colons befindet (Hawker *et al.*, 1980; Sandle *et al.*, 1986). Das anti-diarrhoische Potential der GC lässt sich also einerseits auf ihre generelle anti-inflammatorische Wirkung zurückführen und andererseits auf direkte Effekte auf den Na⁺- und Wassertransport.

Ungeklärt blieb in diesem Zusammenhang bislang die zentrale Frage, wie die verschiedenartige Modulation des durch Mineralo- bzw. Glucocorticoide induzierten ENaC-vermittelten Na⁺-Transports durch pro-inflammatorische Zytokine zustande kommt. Eine Analyse von möglicherweise beteiligten Signalwegen oder der unterschiedlichen Beeinflussung von aktiviertem MR bzw. GR durch Zytokin-induzierte Signale steht noch aus. Im Hinblick auf die Regulation von intestinalen Transportvorgängen ist die Wechselwirkung von Glucocorticoiden und pro-inflammatorischen Zytokinen bisher kaum charakterisiert.

1.8 Existierende Modelle zur Charakterisierung der CED-Pathogenese

Die nähere Charakterisierung der molekularen Mechanismen, die der Pathogenese von CED zugrunde liegen, ist limitiert durch das Fehlen geeigneter Modellsysteme. Die direkte Verwendung humaner Biopsieproben ist möglich, jedoch begrenzen oft Probenverfügbarkeit, ihre Diversität und geringe Größe die Möglichkeiten von molekularbiologischen und biochemischen Analysen sowie deren Reproduzierbarkeit.

Als Alternative wurden verschiedene Tiermodelle etabliert, die jeweils bestimmte Charakteristika entzündlicher Darmerkrankungen repräsentieren. Hier sind einerseits chemisch induzierbare Modelle zu nennen wie das durch intrarektale Applikation von TNBS (*Trinitrobenzenesulfonic acid*) induzierte CED-Mausmodell. Dieses Modell weist klinische Charakteristika von MC auf und zeigt u.a. die NF-κB-vermittelte T_H1-Aktivierung (Ukil *et al.*, 2006) (Cannarile *et al.*, 2009). Andererseits existieren auch genetisch manipulierte Mausmodelle, die eine chronische intestinale Entzündung entwickeln. Dazu zählen das IL-2- und IL-10-*knockout* Mausmodell oder das TNF-α-überexprimierende Mausmodell (Kontoyiannis *et al.*, 1999; Kühn *et al.*, 1993; Sadlack *et al.*, 1993). Die IL-2-*knockout* Maus entwickelt eine chronische Colitis, deren klinische und morphologische Charakteristika stark

der CU ähneln. Die Analyse von Resorptionsvorgängen in diesem Mausmodell ergab eine Inhibition des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports bei fehlendem Barrieredefekt (Barmeyer *et al.*, 2002). Des Weiteren ist auch die elektroneutrale Na⁺-Resorption gestört, was durch eine Herabregulation des NHE3 begründet wurde (Barmeyer *et al.*, 2004b). Da die TNF- α -überexprimierende Maus einen stark dem MC ähnelnden Phänotyp aufweist, konnte hier die Relevanz des Zytokins bestätigt werden. Neben der Analyse von Tiermodellen ist auch die *ex vivo*-Verwendung von Darmgewebe aus Wildtypieren eine häufig genutzte Herangehensweise, bei der dieses für eine gewisse Versuchsdauer unter physiologischen Bedingungen funktionell intakt gehalten werden kann und durch gezielte Zugabe von Agenzien wie Zytokinen die Entzündungssituation simuliert werden kann.

Eine weitere Alternative zu Versuchen an Tiermodellen ist die Kultivierung humaner Darmzellkulturen. Diese haben gegenüber tierischen Geweben aufgrund ihrer Klonalität darüber hinaus den Vorteil geringer Diversität. Bezogen auf die Charakterisierung der Pathogenese von CED konnte mithilfe von Zelllinien z.B. die bei CED vorhandenen Barrieredefekte in intestinalen epithelialen Zellkultursystemen nachempfunden und auch auslösende Faktoren (z.B. Zytokine) und deren Wirkung näher charakterisiert werden (Heller *et al.*, 2005). Für die Untersuchung intestinaler Ionentransportprozesse können ebenfalls verschiedene Zellkultursysteme herangezogen werden. So existieren für das Colon die epithelialen Zelllinien T84, Caco-2 und HT-29, welche alle ihren Ursprung in colorectalen Karzinomen haben. Während die aktive Cl⁻-Sekretion in allen Zelllinien intakt ist, fehlt ihnen jedoch die Aldosteron-induzierte ENaC-Expression und so der aktive, elektrogene Na⁺-Transport (Currid *et al.*, 2004). Bei der Suche nach den ursächlichen Mechanismen wurde für HT-29-Zellen eine fehlende MR- und auch GR-Expression festgestellt (Mick *et al.*, 2001). Der Mangel an endogener ENaC-Expression konnte in dem hochdifferenzierten Subklon HT-29/B6 durch die stabile Transfektion mit dem GR und Glucocorticoid-Stimulation beseitigt werden (Kreusel *et al.*, 1991; Zeissig *et al.*, 2006). Mit wenigen Ausnahmen fehlt auch in den meisten Nierenzelllinien die Expression eines ausreichenden Niveaus von funktionell intaktem MR. In diesen Zellen werden Mineralocorticoide gewöhnlich in mikromolaren Konzentrationen eingesetzt und die von ihnen ausgelösten Effekte müssen daher auf GR-Aktivität zurückgeführt werden (Gaeggeler *et al.*, 2005). Um also die Mechanismen der Aldosteron/MR-abhängigen ENaC-Regulation im Colon und dessen Modulation unter entzündlichen Bedingungen zu untersuchen, bedurfte es der Generierung eines neuen epithelialen Zellmodells, das einen funktionell intakten MR exprimiert.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Glucocorticoide weisen neben ihrem anti-inflammatorischen Einfluss schnelle und ausgeprägte resorptionssteigernde Effekte bei der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) auf, die auf einer verstärkten Resorption von Na^+ und Wasser beruhen. Im distalen Colon bestimmt der epitheliale Na^+ -Kanal (ENaC) den elektrogenen Na^+ -Transport. Während die Mineralocorticoid-abhängige Induktion des ENaC durch bei CED vermehrt vorhandene pro-inflammatorische Zytokine antagonisiert wird, blieb bislang die Frage unklär, durch welche molekularen Mechanismen die ENaC-Induktion durch Glucocorticoide dieser Antagonisierung entgehen kann. Aus diesem Grund sollte im ersten Projektteil dieser Arbeit die Regulation des ENaC im Colon unter dem gleichzeitigen Einfluss des synthetischen Glucocorticoids Dexamethason und des pro-inflammatorischen Zytokins $\text{TNF-}\alpha$ charakterisiert werden. Dazu wurden humane Zellkulturen und Colongewebe der Ratte genutzt. Neben der elektrophysiologischen Charakterisierung der Aktivität des ENaC sollte dabei die Regulation seiner Expression auf mRNA- und Proteinebene erfolgen. Zugrunde liegende regulatorische Mechanismen sollten durch die Analyse der Aktivität des Glucocorticoidrezeptors und der Beteiligung $\text{TNF-}\alpha$ -abhängiger Signaltransduktionswege aufgeklärt werden.

Neben der ENaC-Induktion durch Corticosteroide wurde weiterhin eine transkriptionelle Expressionssteigerung des Kanals durch kurzkettige Fettsäuren beobachtet. Für die Generierung signifikanter Na^+ -Transportraten via ENaC war jedoch die zusätzliche Anwesenheit von Corticosteroiden essentiell, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen ungeklärt blieben. Die molekulare Analyse der Mineralocorticoid-vermittelten ENaC-Induktion wurde bislang erschwert durch den Mangel eines geeigneten Zellkulturmodells, das nach Stimulation des Mineralocorticoidrezeptors (MR) durch nanomolare Mineralocorticoid-Dosen funktionell aktive ENaC-Kanäle exprimiert. In einem zweiten Projektteil dieser Arbeit sollte daher ein Colonzellmodell generiert werden, das den MR induzierbar exprimiert. An diesem Modell sollten die Einflüsse kurzkettiger Fettsäuren in Kombination mit Mineralocorticoiden untersucht werden. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf die für die apikale Lokalisation des ENaC verantwortlichen Mineralocorticoid-induzierten Gene gerichtet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material und Geräte

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Filterpapier (3 mm)	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Gelfiltrationssäulen Performa DTR	Edge Bio, Gaithersburg, USA
Kanüle 0,45 x 10 mm/Spritze 1ml	Becton Dickinson, Madrid, Spanien
Mikrotiterplatten:	
• 96-well, weiß	Nunc, Roskilde, Dänemark
• 96-well, klar	Sarstedt, Nümbrecht
• 96-well, weiß, Boden klar	Nunc, Roskilde, Dänemark
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel Gläser, Braunschweig
PCR-Reaktionsgefäße (8-strip, 0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsplatten	
(MicroAmp Fast Optical 96-well)	Applied Biosystems, Mannheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Transfer-Membran PVDF	Perkin Elmer, Zaventem, Belgien
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Rundboden-Röhrchen (14 ml)	Greiner Bio-One, Essen
Sequenzier-Gefäß mit Septum	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sterilfilter DynaGard (0,2 µm)	Spectrum Laboratories, Breda, Holland
Stabpipetten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Zellkulturfilter Millicell PCF 3 µm	Millipore, Schwalbach
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Zellkulturlochplatten (6-, 12-, 24-, 96-Loch)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturschalen (Ø 10 cm)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellschaber	Sarstedt, Newton, USA

2.1.2 Geräte

Acrylamid-Gelelektrophorese-Kammer	
Mini Protean 3 System	Bio-Rad, Hercules, USA
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer Mini Sub Cell GT	
	Bio-Rad, Hercules, USA
Brutschrank CB-150	Binder, Tuttlingen

CCD-Kamera Lumineszenzbild-Analysator

LAS1000

Fujifilm, Tokyo, Japan

Cryostat Leica CM 1900

Leica, Wetzlar

Feinwaage R 200 D

Sartorius, Göttingen

Heizblock Trio-Thermoblock

Biometra, Göttingen

Magnetrührer IKA-Combimag

Janke & Kunkei KG, Staufen i.Breisgau

Mikroskope:

- Fluoreszenzmikroskop BX60

Olympus, Tokio, Japan

- Konfokales Laser Scanning Mikroskop

LSM 510 META

Zeiss, Jena

- Lichtmikroskop CK2

Olympus, Tokio, Japan

Mikrotiterplattenlesegerät Spectra Classic

Tecan, Grödig, Österreich

Mikrotiterplattenluminometer Centro LB 960

Berthold, Bad Wildbad

Netzgerät Power Pac 200

Bio-Rad, Hercules, USA

Nucleofektionsgerät Nucleofector II

Amaxa, Köln

Real-Time PCR-Cycler 7500 Fast

Applied Biosystems, Mannheim

Schüttelinkubator Aerotron

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Sequenziergerät ABI310

Applied Biosystems, Foster City, USA

Spektrophotometer Nano Drop 1000

Thermo Scientific, Wilmington, USA

Sterilwerkbank BSB4A

Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim

Thermocycler 2720

Applied Biosystems, Mannheim

Ussing-Kammer

Institut f. Klin. Phys., Charité CBF Berlin

UV-Beleuchtungsanlage QuickStore

MS Laborgeräte, Heidelberg

Vakuumentrifuge Univapo 100 H

UniEquip, Martinsried

Voltage-Clamp-Apparaturen CVC6/8

Fiebig, Berlin

Western Blot Transfer-Kammer

Mini Transblot Cell System

Bio-Rad, Hercules, USA

Widerstandsmessgerät

Institut f. Klin. Phys., Charité CBF Berlin

Wippe WT-12

Biometra, Göttingen

Zentrifugen:

- Tischzentrifuge Z 233 MK

Hermle, Wehingen

- Tischzentrifuge Biofuge 13

Heraeus, Hanau

- Mikrotiterplatten-Zentrifuge LMC-3000

Biosan, Riga, Lettland

2. 1. 3 Software

Auswertung von Luminometer-Mikrotiterplattendaten

- Mikrowin Version 4.36

Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath

Auswertung von Mikrotiterplattendaten

- Easywin Fitting Version V6.0a Tecan, Grödig, Österreich

Erstellung von Grafiken

- XACT Version 6.00 97 SciLab GmbH, Leipzig

Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

- LSM510 Version 3.2 SP2 Zeiss, Jena

Real-time PCR Software

- SDS Sequence Detection Software 7500 Fast Version 1.4.0.25
Applied Biosystems, Mannheim

Sequenzdatenvergleich / Alignment

- Chromas Lite Version 2.01 Technelysium Pty Ltd, Australien

Software zur densitometrischen Auswertung

- AIDA Advanced Image Data Analyzer Version 3.21.001
Raytest Isotopenmessgeräte GmbH,
Straubenhardt, Deutschland

Webtools:

Identifikation von Transkriptionsfaktor-Binderegionen

- TESS Transcription Element Search Software (Schug und Overton, 1997)
<http://www.cbil.upenn.edu/tess/techreports/1997/CBIL-TR-1997-1001-v0.0.pdf>

Erstellung von Oligonukleotidsequenzen

- Primer3 Version 0.4.0 (Rozen und Skaletzky, 2000)
<http://frodo.wi.mit.edu/>

2. 2 Reagenzien

2. 2. 1 Laborchemikalien und andere Reagenzien

Acrylamid 30% (37,5 : 1 Mono/Bisacrylamid)	Merck, Darmstadt
Agarose	Serva, Heidelberg
Aldosteron	Sigma-Aldrich, Steinheim
Antarctic Phosphatase Buffer	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Antibiotika: Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, Steinheim
G 418	PAA, Pasching, Österreich
Hygromycin	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
APS	Sigma, Steinheim
Bacto Agar	BD Biosciences, Madrid, Spanien

Bromphenolblau	LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden
BSA (Albumin Fraktion V)	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAPI	Roche, Mannheim
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
FCS	Biochrom AG, Berlin
FCS hormonfrei	Biochrom AG, Berlin
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Hepes	Serva, Heidelberg
H ₂ O (<i>molecular biology reagent</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Längenstandards:	
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
L/HindIII DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Medium	MP Biomedicals, Solon, USA
Medien für die Zellkultur:	
RPMI 1640-Medium	PAA, Pasching, Österreich
DMEM / Ham's F-12-Medium	PAA, Pasching, Österreich
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS	PAA, Pasching, Österreich
PBS-Tabletten	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
PFA 16%	EM Sciences, Hatfield, USA
Pro Taq Mount Fluor	Biocyc, Luckenwalde
Ribonuklease Inhibitor RNase Out	Invitrogen, Karlsruhe
Sab Simplex	Parke-Davis, Berlin
SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Sucrose	Serva, Heidelberg

T4 DNA-Ligasepuffer	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
TAE 50x	Genaxxon, Biberach
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Mannheim
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tissue Tek OCT Compound	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris (1 M, pH 8,8)	Serva, Heidelberg
Tris (0,5 M, pH 6,8)	Biorad, Hercules, USA
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNAzol B	WakChemie, Steinbach
Ziegen-Serum	Biochrom, Berlin

Wenn nicht anders erwähnt, wurden weitere Laborchemikalien von Sigma-Aldrich (Steinheim) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

2. 2. 2 Inhibitoren

Amilorid	ENaC-Blocker	Sigma-Aldrich, Steinheim
BAY11-7082	I κ B- α -Kinase-Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt
Complete w/o EDTA	Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Leupeptin	Cystein/Serin-Protease-Inh.	Sigma-Aldrich, Steinheim
PMSF	Serin-Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim
RU-26752	MR-Antagonist	Sigma-Aldrich, Steinheim
RU-486	GR-Antagonist	Sigma-Aldrich, Steinheim
SB202190	p38 MAPK-Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt
SP600125	JNK MAPK-Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt
Spironolacton	MR-Antagonist	Sigma-Aldrich, Steinheim
U0126	MEK1/2 MAPKK-Inhibitor	Cell Signaling, Frankfurt a. M.

2. 2. 3 Zytokine und Enzyme

Alkalische Phosphatase „Antarctic Phosphatase“	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Zytokine (rekombinant human, rh):	
rhIFN- γ	TEBU, Offenbach

rhTNF- α	TEBU, Offenbach
rhIL-13	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
rhIL-8	TEBU, Offenbach
rhIL-6	TEBU, Offenbach
Restriktionsendonukleasen EcoRV, PmeI, HindIII, XbaI, KpnI	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.

2. 2. 4 Verwendete Kits

BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Bonn
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Mannheim
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
High-Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Mannheim
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim
Lipofectamine Plus (Transfektionskit)	Invitrogen, Karlsruhe
LumiLight ^{Plus} Western Blotting Kits	Roche, Mannheim
Nucleofector Solution R	Amaxa, Köln
NucleoSpin Extract II Kit (Agarose-Gelextraktion)	Macherey-Nagel, Düren
Buffers for Plasmid Isolation	Qiagen, Hilden

2. 2. 5 Antikörper

Tabelle 2. 1: Verwendete Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft
GR (H300)	rabbit	1:200	Santa Cruz, Heidelberg
p-GR (Ser-211)	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
MR	mouse	1:100	Dr. Celso E. Gomez-Sanchez, Jackson, USA (Gomez-Sanchez <i>et al.</i> , 2006)
p38	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
p-p38	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
p-MAPKAPK-2 (Thr334)	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
JNK	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
p-JNK (Thr183/Tyr185)	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
ERK1/2	rabbit	1:2000	Cell Signaling, Danvers, USA

p-ERK-1/2 (Thr202/Tyr204)	rabbit	1:1000	Cell Signaling, Danvers, USA
α-ENaC	rabbit	1:500	Alpha Diagnostic, San Antonio, USA
β-ENaC	rabbit	1:400	Alpha Diagnostic, San Antonio, USA
γ-ENaC	rabbit	1:400	Alpha Diagnostic, San Antonio, USA
β-Actin	mouse	1:5000; 1:50000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Alexa Fluor® 594 anti-rabbit IgG	goat	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor® 488 anti-mouse IgG	goat	1:500	Invitrogen, Karlsruhe

2. 3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung adhärenter eukaryotischer Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit. In wöchentlichem Rhythmus wurden die Zellen durch Ablösen mit Trypsin/EDTA passagiert und erneut auf Zellkulturflaschen bei einer Verdünnung von 1:3,5 bis 1:7 ausgesät. Nach der Ausbildung eines konfluenten Monolayers binnen einer Wachstumsphase von 7 Tagen wurden die Zellen 24 h vor Versuchsbeginn in Gegenwart von hormonfreiem FCS kultiviert.

2. 3. 1 Verwendete Zelllinien und Kulturmedien

HT-29/B6-Zellen	Colorectale Adenokarzinomzelllinie humanen Ursprungs (Kreusel <i>et al.</i> , 1991), kultiviert in RPMI 1640-Kulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.
HT-29/B6-GR-Zellen	Klonale HT-29/B6-Zellen, die stabil mit dem humanen Glucocorticoid Rezeptor (GR-α) transfiziert wurden (Zeissig <i>et al.</i> , 2006), kultiviert unter Zusatz von 500 µg/ml G418.
HT-29/B6-Tet-On-Zellen	Klonale HT-29/B6-Zellen, die stabil mit dem Reverse Tetracycline Transactivator (rtTA) transfiziert wurden, kultiviert unter Zusatz von 200 µg/ml G418 (generiert von Dr. Joachim Mankertz).

2. 3. 2 Zellkultur-Epithelmodell

Zur Untersuchung der Regulation des epithelialen Natrium-Kanals ENaC im menschlichen Colon wurde ein humanes Colonzellkulturmodell (HT-29/B6) genutzt, das durch einen hohen

Differenzierungsgrad ausgezeichnet ist und das das Nachempfinden eines Epithels ermöglicht. Der Subklon HT-29/B6 der humanen colorectalen Adenokarzinomzelllinie HT-29 wurde durch Glucose-Entzug erzeugt (Kreusel *et al.*, 1991). HT-29/B6-Zellen bilden einen polarisierten Monolayer aus, der die funktionellen Charakteristika eines Colonepithels aufweist. So zeigen diese Zellen sowohl Mucusproduktion als auch Cl⁻-Sekretion. Weiterhin bilden sie neben apikalen Mikrovilli (Bürstensaum) auch interzelluläre Tight Junctions aus, was zu einem hohen transepithelialen Widerstand dieser Zellen führt.

Um die Transporteigenschaften dieser Zellen zu untersuchen, wurden sie auf Zellkultur-Filtereinsätzen, die sich in Zellkulturschalen (Ø 6 cm) befanden, ausgesät (Millicell Polycarbonat-PCF, Porengröße 3 µm, Fläche 0,6 cm²). Dies geschah bei einer durchschnittlichen Konzentration von 7×10^5 Zellen/cm². Auf diesen durchlässigen, in einen Zylinder eingefassten Membranen kamen die Zellen sowohl zur apikalen als auch zur basolateralen Seite mit Zellkulturmedium in Kontakt. Nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen bildeten die Zellen konfluente Monolayer aus, die als Epithelmodell im Rahmen u.a. von elektrophysiologischen Experimenten Verwendung fanden. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen für 24 h in Gegenwart von hormonfreiem FCS kultiviert.

2. 3. 3 Zugabe von Reagenzien zu eukaryotischen Zellkulturen

Die Zugabe von Reagenzien zu humanen Colonzellkulturen erfolgte nach vorherigem Ansetzen des Versuchsmediums in einem Falcon-Gefäß. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurde erst das Medium im Innenbereich des Zellkulturfilters ersetzt und dann auf der Außenseite das Versuchsmedium zugefügt. Auf diese Weise wurden Reagenzien im allgemeinen auf der basolateralen und der apikalen Seite zugegeben. Eine Ausnahme von dieser Regel stellte die Inkubation mit Inhibitoren dar (MAP Kinase-Inhibitoren, GR-/MR-Antagonisten). Hier wurde erst sowohl apikal als auch basolateral mit den Inhibitoren vorinkubiert und anschließend wurden weitere Reagenzien zum Versuchsmedium auf der basolateralen Seite hinzugefügt.

2. 3. 4 Generierung stabil transfizierter Zellklone mittels Nukleofektion

Zur Generierung stabil transfizierter Zellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Nukleofektionstechnik angewendet. Bei der Nukleofektion wird wie bei der Elektroporation durch Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes die Permeabilität der Zellmembran erhöht und dadurch ein Transfer von DNA in die Zelle ermöglicht. Allerdings werden bei der Nukleofektion für die betreffende Zelllinie optimierte Reagenzien und elektrische Parameter verwendet. 1×10^6 HT-29/B6-Zellen wurden sedimentiert (200 g, 5 min) und mit 100 µl Nucleofector Solution R sowie 2 µg der betreffenden Plasmid-DNA versetzt. Die

Nukleofektion erfolgte unter Anwendung des Amaxa Nukleofektionsprotokolls W-017. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden anschließend zur klonalen Selektion mit 200 µg/ml G418 bzw. 600 µg/ml Hygromycin auf Zellkulturschalen (Ø 10 cm) verbracht. Hierbei wurden zunächst Zellklone, die eine Resistenz gegenüber dem spezifischen Antibiotikum aufwiesen, einzeln durch Trypsinieren in aufgesetzten, engen Zylindern von den Zellkulturschalen (Ø 10 cm) abgelöst. Es folgte eine Expansion der Klone in Lochplatten beginnend mit 24-well-Platten. In der Phase der Kultivierung auf 6-well-Platten wurden die Klone einem Screening auf positive Integration der MR-cDNA und Funktionalität des MR unterzogen. Dies erfolgte im 96-well-Maßstab durch Reporter-gen-Assay (Abschnitt 2. 3. 4). Bei jeder stabilen Transfektion wurden zusätzlich Klone stabil mit dem jeweiligen Leervektor transfiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die folgende Zelllinie durch stabile Transfektion mittels Nukleofektion erzeugt:

HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen Klonale HT-29/B6-Tet-On-Zellen, die induzierbar mit dem humanen Mineralocorticoid Rezeptor (MR) transfiziert wurden, kultiviert unter Zusatz von 200 µg/ml G418 und 200 µg/ml Hygromycin. Zur Induktion der MR-Expression erfolgte die Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin.

2. 3. 5 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofektion und Reporter-gen-Assay

Um die Aktivität der Promotoren des humanen β - und γ -ENaC-Gens und des CMV-Promotors zu charakterisieren, wurden an HT-29/B6-Zellen Reporter-gen-Assays durchgeführt. Weiterhin wurde auf diese Weise die Transaktivierung durch MR und durch GR analysiert. Zu diesem Zweck erfolgten transiente Transfektionen mittels Lipofektion. Es wurden 5×10^5 Zellen/6-well bzw. 5×10^4 Zellen/96-well unter hormonfreien Bedingungen ausgesät und 24 h später unter Verwendung von Lipofectamine Plus nach Angaben des Herstellers transfiziert. Im 6-well-Maßstab wurden 1 µg und im 96-well-Maßstab 60 ng Reporterplasmid-DNA kodierend für *Photinus pyralis*-Luciferase (Firefly) eingesetzt. Zusätzlich wurden im 6-well-Maßstab 50 ng Koreporterplasmid-DNA kodierend für *Renilla reniformis*-Luciferase zur Berücksichtigung der Transfektionseffizienz eingesetzt. 24 h nach Lipofektion wurden die Zellen unter Verwendung des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems lysiert. Nach Angaben des Herstellers wurden die Luciferase-Aktivitäten in den gewonnenen Lysaten analysiert. Die Aktivität der *Renilla reniformis*-Luciferase wurde zur Normalisierung der *Photinus pyralis*-Luciferase Aktivität herangezogen. Die folgenden Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit für Reporter-gen-Assays verwendet:

Tabelle 2. 2 : Für Reporter-gen-Assays verwendete Vektoren

Name	Beschreibung	Herkunft
pGRE-Luc	Reporterplasmid kodierend für Firefly-Luciferase unter der Kontrolle eines GRE-enthaltenden Promotors	Clontech / BD Biosciences, USA
pGL3-Basic	Reporterplasmid kodierend für Firefly-Luciferase	Promega, USA
pGL4.70	Koreporterplasmid kodierend für <i>Renilla</i> -Luciferase	Promega, USA
pghENaC-A	Reporterplasmid kodierend für Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des γ -ENaC-Promotors (-2926 to +35)	freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Christie P. Thomas, University of Iowa, Iowa City, USA
pghENaC-B	Reporterplasmid kodierend für Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des γ -ENaC-Promotors (-459 to +35)	freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Christie P. Thomas, University of Iowa, Iowa City, USA
pbhENaC-A	Reporterplasmid (pGL3-Basic) kodierend für Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des β -ENaC-Promotors (-1137 to +200)	generiert von Dr. Salah Amasheh, Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin
pMMTV-Luc (Maus-Mammatumovirus)	Reporterplasmid kodierend für Firefly-Luciferase unter der Kontrolle eines HRE-enthaltenden Promotors	freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Steffen Borden, Bayer Schering Pharma, Berlin
pcDNA3.1(+)-Luc	Reporterplasmid kodierend für Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des CMV-Promotors	generiert im Rahmen der vorliegenden Arbeit

2. 4 Molekularbiologische Methoden

2. 4. 1 Klonierungsstrategie zur Generierung des Reporterplasmids pcDNA3.1(+)-Luc

Zur Charakterisierung der Aktivität des CMV-Promotors nach Transfektion in HT-29/B6-GR-Zellen wurde ein Reporterkonstrukt kodierend für Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des CMV-Promotors erzeugt. Zu diesem Zweck wurde in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) das Firefly-Luciferasegen eingebracht. Dieses wurde durch Verdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI aus dem Vektor pGL3-Basic gewonnen und über kohäsive Enden in den mit HindIII und XbaI linearisierten Vektor pcDNA3.1(+) ligiert. Das resultierende Konstrukt pcDNA3.1(+)-Luc wurde für transiente Transfektionen im Reporter-gen-Assay eingesetzt.

2. 4. 2 Klonierungstrategie zur Generierung des Expressionsplasmids pTRE2hyg-hMR

Zur Generierung eines HT-29/B6-Zellklons, der induzierbar den humanen Mineralocorticoid Rezeptor exprimiert, wurde das Clontech Tet-On™ Gene Expression Systems verwendet. Dazu wurde das hMR-Gen in den Vector pTRE2hyg eingebracht, der eine Tet response element-abhängige Genexpression ermöglicht. Die kodierende Sequenz des hMR, enthalten im Expressionsplasmid pcDNA3.1(+)-Zeo, wurde freundlicherweise von Dr. Steffen Borden, Bayer Schering Pharma, Berlin, zur Verfügung gestellt. Nach Ausschneiden durch Verdau mit dem Restriktionsenzym Pmel wurde die kodierenden Sequenz des hMR über glatte Enden in den mit EcoRV linearisierten Vektor pTRE2hyg ligiert. Das resultierende Konstrukt pTRE2hyg-hMR wurde zur stabilen Transfektion von HT-29/B6-Tet-On-Zellen verwendet. In Tabelle 2. 2 sind die im Rahmen der Generierung von Expressions- und Reporterplasmiden verwendete Vektoren unter Angabe ihrer Herkunft aufgeführt.

Tabelle 2. 3 : Im Rahmen der Generierung von Plasmiden verwendete Vektoren

Name	Beschreibung	Herkunft
pcDNA3.1(+)	Eukaryotisches Expressionsplasmid zur konstitutiven Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors	Invitrogen, USA
pTRE2hyg	Eukaryotisches Expressionsplasmid zur induzierbaren Expression unter der Kontrolle des Tet responsive promoter	Clontech / BD Biosciences, USA
pTet-On	Eukaryotisches Expressionsplasmid zur konstitutiven Expression von rtTA unter der Kontrolle des CMV-Promotors	Clontech / BD Biosciences, USA
pcDNA3.1-Zeo-hMR	Eukaryotisches Expressionsplasmid kodierend für den humanen Mineralocorticoid Rezeptor	freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Steffen Borden, Bayer Schering Pharma, Berlin
pTRE2hyg-hMR	Eukaryotisches Expressionsplasmid kodierend für den humanen Mineralocorticoid Rezeptor unter der Kontrolle des Tet responsive promoter	generiert im Rahmen der vorliegenden Arbeit

2. 4. 3 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von Restriktionsendonucleasen der Firma New England Biolabs (NEB) durchgeführt. Alle dafür nötigen Puffersysteme wurden ebenfalls von NEB bezogen. Der Verdau von jeweils 2 µg DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2. 4. 4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen kann mittels einer Messung der Absorption bei $\lambda=260$ nm vorgenommen werden. Bei dieser Wellenlänge besitzen 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA eine optische Dichte von 1 (1 OD). Mithilfe der Bestimmung des Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm wurde die Reinheit der Nukleinsäurepräparationen kontrolliert. Für reine Lösungen ist hier ein Quotient von 1,8 – 1,9 zu erwarten. Zur Absorptionsmessung wurde das Spektrophotometer Nano Drop 1000 verwendet.

2. 4. 5 Agarosegel-Elektrophorese und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Agarosegel-Elektrophorese erfolgte zur Auftrennung von DNA für analytische und präparative Zwecke. Dazu wurde ein 1% Agarosegel verwendet. Als Längenstandards dienten λ HindIII Ladder sowie 100 bp Ladder.

- 1x Laufpuffer: 1x TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA-Na, 20 mM Essigsäure, pH 8,5), 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid
- 6x Probenpuffer: 40% Saccharose, 0,25 % Bromphenolblau, 5 mM EDTA pH 8,0

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde das betreffende Fragment ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. Dies basierte auf der Auflösung des Agarosegelpartikels in einem Hochsalzpuffer und anschließender Bindung der DNA an eine Silica-Membran. Die Reinigung erfolgt durch Waschen mit einem Ethanol-haltigen Hochsalzpuffer und anschließender Elution unter leicht alkalischen Niedrigsalzbedingungen.

2. 4. 6 Dephosphorylierung von linearisierter DNA und Ligation

Zur Verhinderung der Religation nach Plasmidlinearisierung wurde Vektor-DNA am 5'-Ende dephosphoryliert. Dies erfolgte unter Verwendung des Enzyms Alkalische Phosphatase („Antarctic Phosphatase“) für 60 min bei 37°C nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde der Vektor erneut aufgereinigt unter Verwendung des High Pure PCR Product Purification Kits.

Zur Ligation des gewünschten Inserts in den Expressionsvektor wurden 50 ng Vektor-DNA mit einem 2-3 fachen Überschuss an Insert-DNA in Anwesenheit des Enzyms T4 DNA Ligase inkubiert. T4 DNA Ligase katalysiert die Bildung der Phosphodiesterbindung zwischen 5'Phosphat- und 3'Hydroxylgruppe der DNA. Gemäß den Angaben des Herstellers

wurden die Ligationen in einem Gesamtvolumen von 20 µl entweder bei 15°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 30 min durchgeführt.

2. 4. 7 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente *E. coli* (*E. coli* TOP 10F', Invitrogen, Karlsruhe) transformiert. Dazu wurden 3 µl des beschriebenen Ligationsansatzes mit 50 µl TOP 10F' Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C, danach wurden die Zellen 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Zellen für 1,5 h bei 37°C und 225 rpm bewegt und anschließend auf mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzte LB-Agarplatten ausplattiert. Über Nacht bei 37°C gewachsene Kolonien wurden für weitere Anwendungen gepickt.

- LB-Agar: 4,5 g Bacto Agar in 300 ml LB-Medium
- LB-Medium: 25 g LB-Medium ad 1 l Aqua dest.

2. 4. 8 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde eine auf Platten gewachsene *E. coli*-Kolonie in 4 ml LB/Ampicillin-Medium übertragen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die in 1,5 ml dieser Suspension enthaltenen Bakterien wurden pelletiert (1min, 5000 rpm). Die Plasmidisolierung erfolgte wie im Folgenden beschrieben unter Verwendung eines von Qiagen (Hilden) bezogenen Puffersystems. Das Bakterienpellet wurde dazu in 300 µl Resuspension Buffer P1 (mit RnaseA 100 µg/ml) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 300 µl Lysis Buffer P2 und Invertieren aufgeschlossen. Nach Zugabe von 300 µl Neutralization Buffer P3 und 15-minütiger Inkubation wurde für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. 800 µl des Überstandes wurden mit 400 µl Isopropanol versetzt, erneut zentrifugiert (15 min, 13000 rpm). Das gewonnene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend für Sequenzierungsreaktionen in 50 µl H₂O resuspendiert.

2. 4. 9 PCR und Sequenzierung der Konstrukte

Die erzeugten Konstrukte wurden auf der Basis der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* sequenziert (Sanger *et al.*, 1977). Dies geschah unter Verwendung des Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, Mannheim). Für die Sequenzierung des pTRE2hyg-hMR-Konstrukts wurden die Oligonukleotide pTRE2FOR (5'-CACCGGGACCGATCCAGCCTC-3') bzw. pTRE2REV (5'-GAAAGAACAATCAAGGGTCCC-3') als Primer verwendet. pcDNA3.1(+)-Luc wurde mit den Primern T7 short (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3) und BGHrev (5'-TAGAAGGCACAGTCGAGGCT-3')

sequenziert. Folgendes PCR-Programm wurde in diesem Zusammenhang verwendet: 5 min 96°C, 25 Cyclen: 10 sec 96°C, 5 sec 55°C, 4 min 60°C. Zur Entfernung überschüssiger Nukleotide und Primer wurden die Sequenzierungsansätze nach der PCR durch Gelfiltration aufgereinigt. Diese auch als Ausschluss-Chromatographie bezeichnete Methode ermöglicht die Elution von Molekülen oberhalb einer bestimmten Größe. Moleküle unterhalb dieser Größe werden aufgrund ihres Einwanderns in die Poren des Gelfiltrationsmaterials erst später eluiert. Es wurden dazu Gelfiltrationssäulen (Performa DTR, EdgeBio, Gaithersburg, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach Einengen der Probe in der Vakuumzentrifuge auf 5 µl und Versetzen mit 20 µl Template Suppression Reagent wurde die DNA für 3 min bei 96°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Die Sequenzierung erfolgte im Sequenziergerät ABI310 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

2. 4. 10 Glycerolstocks

Zur Langzeitlagerung von Bakterienkulturen (*E.coli*) wurden Glycerolstocks angefertigt. Dazu wurden 850 µl einer über Nacht bei 37°C gewachsenen Kultur mit 150 µl Glycerol versetzt, das die Ausbildung von Eiskristallen verhindert. Anschließend wurde diese Suspension in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Zum erneuten Ausplattieren der Bakterien wurde der gefrorene Glycerolstock nicht aufgetaut, sondern es wurde nur oberflächlich Bakterienmaterial abgenommen.

2. 4. 11 RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellkulturen oder Rattengewebe basierte auf der Single-Step-Methode durch Guanidinium Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski *et al.* (Chomczynski & Sacchi, 1987). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu RNazol B der Firma WakChemie, Steinbach, nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurde die RNA durch Abtrennung der wässrigen Phase isoliert, DNA und denaturierte Proteine fanden sich in der organischen bzw. Interphase. Anschließend wurde die RNA mit Isopropanol gefällt und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das erhaltene RNA-Pellet wurde in 30 - 50 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

2. 4. 12 Reverse Transkription und Real-time PCR

Für die Synthese von cDNA durch reverse Transkription der mRNA wurden 2 µg der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Dies erfolgte unter der Verwendung des High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Dabei dienten zufällig verteilte Hexamer-Nukleotide als Primer.

Zur Charakterisierung des Expressionsniveaus eines Gens unter verschiedenen Bedingungen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Real-time PCR genutzt. Dabei kamen für das jeweils untersuchte Gen eine Primerkombination und mit dem Fluorophor FAM gekoppelte MGB (minor groove binder)-Sonden zum Einsatz (Tabelle 2.3). Als endogene Kontrolle diente das GAPDH-Sondensystem bestehend aus einer Primerkombination und VIC/TAMRA-Fluorophor-gekoppelter Sonde. 2 µl der synthetisierten cDNA wurden in einem PCR-Ansatz von 20 µl eingesetzt. Die Real-time PCR wurde in einem 7500 Fast Real-Time PCR-Cycler der Firma Applied Biosystems (Mannheim) durchgeführt. Dabei wurde folgender Temperaturverlauf angewendet: 95°C 10 min, 45 Zyklen: 95°C 15 sec, 60°C 60 sec. Die endogene Kontrolle diente zur Normalisierung der Ct-Werte (threshold cycle) des untersuchten Gens. Die quantitative Auswertung erfolgte mithilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode nach Livak *et al.*, 2001).

Tabelle 2. 4 : Sonden für Real-time PCR

Gen	Assay-Bezeichnung human	Assay-Bezeichnung Ratte
α-ENaC	HS00168906_m1	RN00580652_m1
β-ENaC	HS00165722_m1	RN00561892_m1
γ-ENaC	HS00168918_m1	RN00566891_m1
SGK-1	HS00178612_m1	RN00570285_m1
GILZ (<i>TSC22D3</i>)	HS00608272_m1	RN00580222_m1
K-Ras2A	HS00364282_m1	
GR-α	HS00230818_m1	
MR	HS00230906_m1	

2. 5 Proteinchemische Methoden

2. 5. 1 Gewinnung von Zelllysaten

Lysate aus eukaryotischen Zellkulturen wurden abhängig von den Proteinen, die untersucht werden sollten, nach verschiedenen Protokollen präpariert. Die Lysate wurden in jedem Fall aus konfluenten, auf Zellkulturfiltern gewachsenen Zellen gewonnen.

Zelllysatgewinnung für die Analyse von Corticosteroidrezeptoren

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, und 60 µl Lysepuffer/Filter wurde hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen vom Filter geschabt und resuspendiert. Zur Verbesserung der Lyseeffizienz wurden sie in flüssigem Stickstoff gefroren, wieder aufgetaut

und 10 x durch eine 0,45 mm-Nadel gezogen. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Zelllysate als Überstand nach Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, 4 °C) gewonnen.

- Lysepuffer: 20 mM Hepes (pH 7,6); 1,5 mM MgCl₂; 420 mM NaCl; 25% Glycerol; 0,2 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 0,5 µg/ml Pepstatin A; 1x Complete Inhibitor Cocktail (bei Detektion phosphorylierter Proteine Zugabe von weiteren Inhibitoren, u.a. Phosphatase-Inhibitoren: 2,5 mM Natriumpyrophosphat; 1 mM β-Glycerophosphat; 1 mM Na₃VO₄; 1 µg/ml Leupeptin; 1 mM EGTA)

Zelllysatzgewinnung für die Analyse von MAP-Kinasen

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Dann wurde 250 µl Lysepuffer/Filter hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend vom Filter geschabt und homogenisiert. Das Zelllysate wurde als Überstand nach Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm, 4 °C) gewonnen.

- Lysepuffer: 20 mM Tris (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1% Triton-X-100; 2,5 mM Natriumpyrophosphat; 1 mM β-Glycerophosphat; 1 mM Na₃VO₄; 1 µg/ml Leupeptin ; 1 mM PMSF

Zelllysatzgewinnung für die Analyse von ENaC-Untereinheiten

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, anschließend in 150 µl PBS vom Filter geschabt und pelletiert (1000 g, 1 min). Pro Versuchsbedingung wurden die Zellen von 7 Filtern vereinigt und in 180 µl Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden sie für 30 min auf Eis inkubiert und das Zelllysate dann als Überstand nach Zentrifugation gewonnen (15 min, 15000 g, 4 °C).

- Lysepuffer: 10 mM Tris-Cl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,5% Triton-X-100; 0,1% SDS; 1x Complete Inhibitor Cocktail; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM PMSF

Die Zelllysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2. 5. 2 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen nach der BCA-Methode (Thermo Scientific, Bonn) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der quantitativen Reduktion von Cu²⁺ durch Proteine zu Cu¹⁺ in alkalischer Lösung. In einem zweiten Schritt bildet Cu¹⁺ mit Bicinchoninsäure einen Chelatkomplex aus, welcher ein Absorptionsmaximum bei 562 nm aufweist. Zur

Proteinkonzentrationsbestimmung wurde eine Eichreihe mit BSA-Lösungen von 0,2, 0,8 und 1,2 mg/ml pipettiert. Zu jeweils 10 µl dieser Lösungen und verschiedenen Volumina der unbekannt Proteinelösungen wurden im 96-well 190 µl des BCA-Reagenz gegeben. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend wurde die Absorption bei 562 nm vermessen. Anhand der erstellten Eichgerade wurden die Proteinkonzentrationen der unbekannt Proben ermittelt.

Eine zweite Methode der Ermittlung von Proteinkonzentrationen war die Messung der Absorption im nahen UV bei $\lambda=280$ nm. Bei dieser Wellenlänge weisen Proteinelösungen eine Absorption durch die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan auf. Die Messung erfolgte unter Verwendung des Spektrophotometer Nano Drop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA). 1 OD wurde hierbei mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml gleichgesetzt.

2. 5. 3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Proteinproben wurden dazu mit 1x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Für die Western Blot-Detektion von ENaC-Untereinheiten wurden erfolgte dies bei 65°C für 10 min, um einer Aggregatbildung entgegenzuwirken.

Für die Auftrennung der Proteine wurden die Gele mit einer Gesamtmenge von 20 µg Protein zur Detektion von MAP-Kinasen, 40 µg zur Detektion von Corticosteroidrezeptoren und 100 µg zur Detektion von ENaC-Untereinheiten beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Schichtdicke des Gels von 1,5 mm im Biorad Mini-Protean Elektrophorese-System bei 100 V für ca. 1,5 h.

- 5x SDS-Probenpuffer: 125 mM Tris pH 6,8, 10% SDS, 500 mM DTT, 0,001% Bromphenolblau, 50% Glycerol
- Elektrophorese-Laufpuffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% SDS
- Sammelgel-Zusammensetzung: 5,1% Acrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,05% TEMED
- Trenngel-Zusammensetzung: 470 mM Tris pH 8,8, 8,5% - 10% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED

2. 5. 4 Western Blot-Analyse

Für die Detektion von Proteinen mittels Western Blot wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mithilfe des „Tankblot“-Verfahrens auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde das Biorad Mini Transblot Cell System genutzt. Der Blot wurde wie folgt geschichtet, wobei Schwämme und Whatman-Papiere in Transferpuffer getränkt waren:

Kathode (-)

Schwamm

1 Whatman-Papier

SDS-Polyacrylamid-Gel

PVDF-Membran

1 Whatman-Papier

Schwamm

Anode (+)

Nach dem Proteintransfer wurden freie Bindestellen auf den Membranen für mindestens 1 h blockiert, dann erfolgte die Antikörperinkubation entweder bei 4°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 2 h. Die Antikörper wurden in 5% BSA / 0,02% NaN₃ in PBS-T bzw. TBS-T angesetzt (siehe Tabelle 2.4). Nach Waschen (2 x 5 min PBS-T, 1 x 5 min TBS-T) wurden die Membranen unter Verwendung des LumiLight^{Plus} Western Blotting Kits für 1,5 h mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion von Chemilumineszenz-Signalen mithilfe einer CCD-Kamera (LAS 1000). Zur Detektion von phosphorylierten Epitopen erfolgten alle Inkubations- und Waschschrte nicht in PBS-T-, sondern ausschließlich in TBS-T-haltigen Lösungen.

- Transferpuffer: 20% Methanol, 192 mM Glycin, 25 mM Tris
- Blockierungslösung: 5% BSA, 0,02% NaN₃ in PBS-T bzw. TBS-T
- PBS-T: 1x PBS, 0,1% Tween-20
- TBS-T: 10 mM Tris pH 7,3, 137 mM NaCl, 0,1% Tween-20

2. 6 Elektrophysiologische Methoden

2. 6. 1 Die Ussing-Technik

Zur Charakterisierung transepithelialer Transportvorgänge wurde im Rahmen dieser Arbeit die Ussing-Technik angewandt (Ussing & Zerahn, 1951). Mithilfe dieser Methode ist es möglich, die elektrophysiologischen Parameter wie die transepitheliale Spannung und den Kurzschlussstrom eines nativen Epithels zu messen. Zusätzlich ermöglicht die Ussing-

Technik die Zugabe von Substanzen, wie z.B. Kanalblockern, zum Epithel mit simultaner Aufzeichnung der Auswirkungen der Zugabe auf Transportvorgänge und Barriereeigenschaften des Gewebes.

Zu diesem Zweck werden entweder distales Colonepithel oder epitheliale Zellkulturen in eine Ussing-Kammer eingespannt (Abb. 2. 1). Dabei werden zwei Kammerhälften durch ein zentral eingespanntes Epithel voneinander getrennt, so dass ein Molekültransport zwischen ihnen nur durch das Epithel möglich ist. Jede Kammerhälfte wird mit 0, 5 ml und der Wärmetauscher auf jeder Seite mit 9,5 ml physiologischer Ringer-Lösung gefüllt, die während des gesamten Versuchs auf 37°C temperiert und ständig mit einer Gasmischung von 95% O₂ / 5% CO₂ durchperlt wird. Durch das Ausströmen des Gases wird zudem eine Zirkulation der Ringer-Lösung innerhalb der Ussing-Kammer und die Einstellung eines konstanten pH-Wertes von 7, 4 bewirkt.

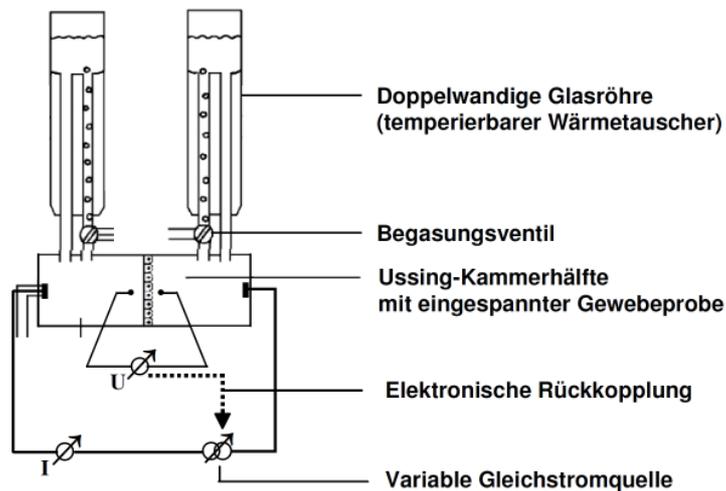


Abb. 2. 1: Ussing-Versuchsstand. Das zwischen zwei Kammerhälften der doppelwandigen Ussing-Kammer eingespannte Epithel wird von einer auf 37°C temperierten Badlösung umspült. Mithilfe zweier Elektrodenpaare werden Potentialdifferenz sowie Kurzschlussstrom registriert (modifiziert nach: Li *et al.*, 2004).

Zur Messung der elektrophysiologischen Parameter befinden sich zwei Elektrodenpaare innerhalb der Halbzellen in Kontakt mit der Lösung. Die stromleitende Verbindung wird hierbei durch Agar-Brücken und mit KCl (3M) gefüllte Gefäße realisiert. Das eine der beiden Elektrodenpaare befindet sich in unmittelbarer Nähe des eingespannten Epithels und dient der Messung der Potentialdifferenz mithilfe eines Voltmeters. Das zweite Paar in größtmöglichem Abstand zum Epithel ist an eine variable Gleichstromquelle sowie ein Amperemeter angeschlossen.

Der über das untersuchte Epithel stattfindende Ionentransport induziert eine Potentialdifferenz, welche über das Voltmeter messbar ist. Dieses Potential wird mithilfe des

zweiten Elektrodenpaares (Ag/AgCl) durch die Generierung eines externen Stromflusses kurzgeschlossen, der genau so groß ist, dass das Potential über dem Gewebstück auf Null gesetzt wird. Abb. 2. 2 zeigt schematisch die Anordnung von Epithel und Elektroden innerhalb der Ussing-Kammer. Dieser sogenannte Kurzschlussstrom (I_{SC}) repräsentiert daher die Größe des Nettoladungstransports durch das Epithel selbst. Registriert wird dieser Ladungstransport als Kurzschlussstromdichte einwertiger Ionen in $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ bzw. $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ und wird im Folgenden im Rahmen dieser Arbeit als „Kurzschlussstrom“ bezeichnet.

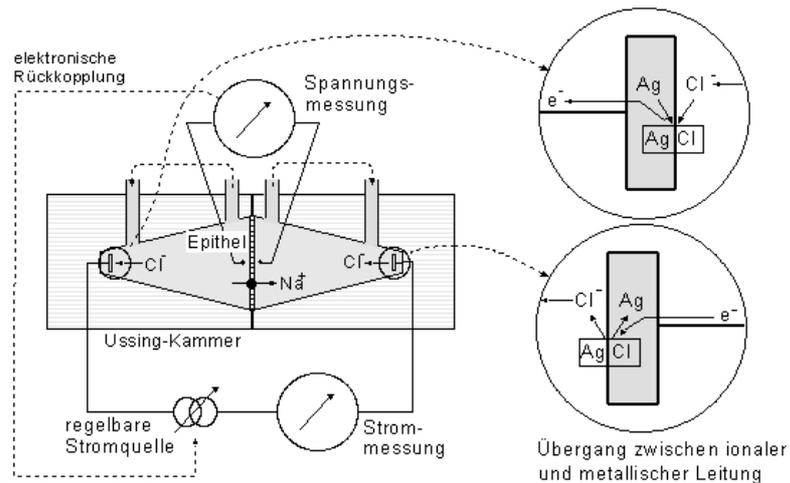


Abb. 2. 2: Die Ussing-Kammer. Das durch Ionentransport über das mittig in die Ussing-Kammer eingespannte Epithel erzeugte Potential wird durch die Generierung eines externen Stromflusses kurzgeschlossen. Dazu dienen die über Agarbrücken mit der Flüssigkeit im Innenraum der Ussing-Kammer in Kontakt stehenden Ag/AgCl-Elektroden. Der Kurzschlussstrom wird durch eine elektronische Rückkopplung aus der Potentialmessung eines zweiten Elektrodenpaares bestimmt (nach Fromm, Praktikumsskript).

2. 6. 2 Ermittlung des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms in der Ussing-Kammer

Der ENaC-vermittelte Natriumtransport in einem bestimmten Epithel kann mithilfe der Ussing-Technik unter Verwendung des selektiven Kanalblockers Amilorid analysiert werden. Vor Beginn einer jeden Messung wird dabei zunächst eine Leerwertbestimmung vorgenommen. Dazu wird die Ussing-Kammer ohne eingespanntes Epithel mit der auch für den späteren Versuch genutzten Lösung befüllt. Nach einer kurzen Äquilibrierungsphase werden dann der Badwiderstand sowie das Asymmetriepotential vermessen und gespeichert. Das Asymmetriepotential wird vermessen, da jede Elektrode herstellungsbedingt bei einem pH-Wert von 7 nicht den idealen Potentialunterschied von 0 V aufweist. Die gespeicherten Leerwerte dienen der Korrektur der im Versuch gewonnenen Messwerte. Nach Einspannen eines Epithels wird während des Versuchs dann zunächst der Nettoladungstransport des Epithels charakterisiert, und der transepitheliale Widerstand wird aufgezeichnet. Am Versuchsende kann aus der Änderung des Nettoladungstransports nach

apikaler Zugabe von Amilorid (10^{-4} M) - dem Amilorid-sensitiven Kurzschlussstrom (ΔI_{SC}) - spezifisch der ENaC-vermittelte Natriumtransport ermittelt werden.

Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl an nativem distalen Colon (Ratte) als auch an humanen epithelialen Colonzelllinien durchgeführt (siehe Abschnitte 2. 7. 2. 1 und 2. 7. 2. 2).

Die folgenden Puffer wurden für elektrophysiologische Messungen verwendet:

- Ringerlösung („#111“): in mM: Na^+ , 140; Cl^- , 123,8; K^+ , 5,4; Ca^{2+} , 1,2; Mg^{2+} , 1,2; HPO_4^{2-} , 2,4; H_2PO_4^- , 0,6; HCO_3^- , 21; D(+)-Glucose, 10; Glutamin, 2,5; D(+)-Mannose, 10; β -OH-Butyrat 0,5; Antibiotika: Piperacillin (50 mg/l), Imipenem (4 mg/l)
- Amilorid-Stocklösung: Amilorid (10^{-4} M) in Ringer („#111“)

2. 6. 2. 1 Elektrophysiologische Messungen an humanen Colonzelllinien

Zur Untersuchung von ENaC-vermitteltem Natriumtransport in humanen Zellkulturen wurden konfluente, auf Filtern gewachsene HT-29/B6-Zellen elektrophysiologisch charakterisiert. Diese Zellen bilden über eine Wachstumsperiode von 7 Tagen dichte, polare Monolayer aus. Zur elektrophysiologischen Charakterisierung wurden die Zellen nach verschiedenen Inkubationsperioden in die Ussing-Kammer eingebaut. Zu diesem Zweck wurde der gesamte Zellkulturfiltereinsatz mit dem darauf befindlichen Zellmonolayer in eine Hälfte der Ussing-Kammer eingesetzt und mit der anderen Hälfte geschlossen. So entstand eine seitlich dicht abgeschlossener, aber in apikal und basolateraler Richtung mit der Versuchslösung in Kontakt stehender Zellbereich einer Fläche von $0,6 \text{ cm}^2$. Beide Kammerhälften wurden mit 10 ml Ringerlösung („#111“) gefüllt. Nach einer Äquilibrationsphase von ca. 30 min wurde Amilorid in einer Konzentration von 10^{-4} M zugegeben und die Messung für weitere 10 min fortgesetzt. Während der gesamten Messdauer wurden der Kurzschlussstrom und die Spannungs- bzw. Widerstandsparameter im Abstand von jeweils 10 sec aufgezeichnet. Nach Versuchsende wurden die Zellen entweder verworfen oder zur RNA-Isolierung bzw. Protein-Gewinnung weiterverwendet.

2. 6. 2. 2 Elektrophysiologische Messungen an distalem Rattencolon

Neben elektrophysiologischen Messungen an humanen Zellkulturen wurden auch Versuche an distalem Rattencolontgewebe durchgeführt. Als Versuchstiere dienten männliche Albino-Wistar-Ratten, die eine Standard-Rattennahrung und freien Zugang zu Wasser erhielten. Nach dem Töten der Tiere durch CO_2 -Inhalation wurde das Colon entnommen, vom Darminhalt befreit und der Länge nach entlang des Mesenterialansatzes aufgeschnitten. Durch „totales Strippen“ wurden Serosa und Muskelschichten entfernt, so dass zum

Einspannen in die Ussing-Kammer ausschließlich Epithel, Lamina Propria und die äußere Schicht der Muskularis Mukosa genutzt wurden (Abb. 2. 3) (Fromm *et al.*, 1993). Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Gewebe war zwischen dem im Colon konstant vorhandenen Lymphknoten (bei ca. 2 cm ab ano) und dem Anus lokalisiert, das auch als spätdistales Colon-Segment 2 (*late distal colon 2nd segment*, LDC-2) bezeichnet wird.

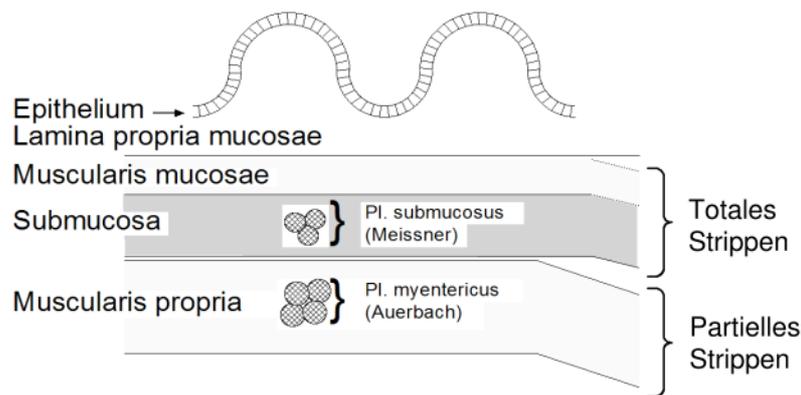


Abb. 2. 3: Schematischer Aufbau der Darmwand. Im Rahmen dieser Arbeit wurde total gestripptes Rattencolon verwendet. Dabei wurden die folgenden nach dem Strippen verbleibenden Schichten der Darmwand in die Ussing-Kammer eingespannt: Epithel, Lamina Propria und äußere Schicht der Muskularis Mukosa (modifiziert nach: Hegel & Fromm, 1990).

Das gewonnene Gewebe wurde durch Aufspannen über Nadeln auf der Kontaktfläche der einen Hälfte der Ussing-Kammer fixiert und mit der anderen Hälfte geschlossen. So entstand ein seitlich dicht abgeschlossener, aber in apikal und basolateraler Richtung mit der Versuchslösung in Kontakt stehender Gewebebereich einer Fläche von 0,54 cm². Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich Gewebe des distalen Colons verwendet.

Nach Einspannen des Gewebes wurde analog den Versuchen mit humanen Zellkulturen beide Hälften der Ussing-Kammer mit Ringerlösung („#111“, 9 ml) gefüllt. Nach einer Äquilibrierungsphase von 30 min wurde zu beiden Seiten 1 ml hormonfreies, hitzeinaktiviertes FCS zur Absättigung der Glasoberflächen und 10 µl Sab Simplex zur Reduktion von Schaumbildung zugefügt.

Nach weiteren 30 min erfolgte im Falle von Versuchen mit dem Zytokin TNF-α zunächst eine Vorinkubation mit IFN-γ (1000 U/ml) für 1 h. Diese Inkubation diente der Verstärkung der TNF-α-Sensitivität des Gewebes. Wie bereits für zahlreiche Colonzelllinien gezeigt wurde, geschieht dies über eine Induktion der TNF-Rezeptor-Expression (Wang *et al.*, 2006a). Anschließend erfolgte eine gleichzeitige Zugabe von TNF-α (10.000 U/ml) und Dexamethason (1 µM) für 14 h. Im Falle der Inkubation mit Aldosteron (3 nM) wurde zunächst für 6 h mit TNF-α inkubiert, dann wurde für weitere 8 h Aldosteron zugegeben.

Generell erfolgte die Zugabe der Zytokine auf der serosalen Seite des Gewebes, die Zugabe von Corticosteroiden erfolgte sowohl serosal als auch mukosal.

Zur Analyse der Wirkung kurzkettiger Fettsäuren in Kombination mit Mineralocorticoiden wurde das Epithel in der Ussing-Kammer beidseitig mit Aldosteron (3 nM) und/oder Butyrat (2 mM) für 1,5 bzw. 4 h inkubiert.

Am Ende des jeweiligen Experimentes wurde der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport durch Zugabe von Amilorid (10⁻⁴ M) wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben ermittelt. Nach Versuchsende wurden die Gewebe aus der Ussing-Kammer ausgebaut und zur weiteren Verwendung (u.a. RNA-Isolation, Protein-Gewinnung) in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.7 Immunologische Methoden

2.7.1 Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Visualisierung der Lokalisation und des Expressionsniveaus von Corticosteroidrezeptoren in humanen Zellkulturen wurden diese einer Immunfluoreszenz-Färbung unterzogen. Dazu wurden einerseits konfluente, auf Filtern gewachsene HT-29/B6-GR-Zellen für 20 min in 4% PFA (in PBS) bei Raumtemperatur fixiert und das Crosslinking dann durch Inkubation mit Glycin (25 mM in PBS, 5 min) gestoppt. Anschließend wurden die Zellen für jeweils mindestens 1 h bei 4 °C bei steigenden Sucrose-Konzentrationen inkubiert (10%, 20% und 30% in PBS) und dann zur Anfertigung von Cryoschnitten eingebettet (Tissue Tek OCT). Cryoschnitte einer Stärke von 7 µm wurden zur Permeabilisierung für 7 min mit dem nicht-ionischen Detergens Triton-X-100 (0,5% in PBS) inkubiert. Zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindung wurde für 60 min mit 6% Goat Serum / 1% BSA (in PBS) blockiert. Es folgte eine 1-stündige Inkubation mit Anti-GR-Antikörper bei 37 °C (1:50, H300). Nach dreimaligem Waschen wurde für 1 h bei 37 °C mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG (1:500) inkubiert. Abschließend wurde zur Kernfärbung für 10 min mit DAPI in einer Verdünnung von 1:1000 (in PBS) inkubiert und unter Verwendung des Eindeckmittels Pro Taqs Mount Fluor mit einem Deckglas abgedeckt.

Im Falle der Detektion des MR in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen wurden konfluente, auf Filtern gewachsene Zellen ohne die Anfertigung von Cryoschnitten für die Immunfluoreszenz-Färbung verwendet. Hierbei wurden die Zellen auf dem gesamten Filter abweichend nur für 30 min blockiert. Die Antikörperinkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Es wurde als Primärantikörper Anti-MR (1:50, 1-18 6G1 (Gomez-Sanchez *et al.*, 2006)) und als Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (1:500) verwendet.

2.8 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Im Unterschied zur gewöhnlichen Mikroskopie ermöglicht die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (LSM) die Abbildung sehr dünner Proben-schichten. Dies wird durch den Einsatz einer Lochblende (pinhole) und das Abrastern der Probe durch einen Laser realisiert. Anregende Laserstrahlung wird in die untersuchte Probe fokussiert. Das von dort ausgesandte Licht passiert das Objektiv und trifft vor der Detektion auf die Lochblende, die sich in der Bildebene des Objektivs befindet. Licht aus Ebenen über oder unter der Fokusebene wird daher weitestgehend am Durchtritt durch die Lochblende gehindert, so dass fast ausschließlich Licht aus einem definierten Punkt der Fokusebene detektiert wird. Auf diese Weise wird das entstehende Bild nicht durch eine unscharfe Abbildung von Punkten außerhalb der Fokusebene überlagert. Um die gesamte Ebene abzubilden, rastert der Laserstrahl die Probe zeilenweise ab. Zur Visualisierung verschiedener Molekülspezies in einem einzigen biologischen Präparat wird die Markierung dieser mit an unterschiedliche Fluorophore gekoppelte Antikörper ausgenutzt. Bei verschiedenen Wellenlängen emittierende Laser können dann die Fluoreszenz der jeweiligen Fluorophore anregen, welche unter Verwendung passender Filter detektiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop des Typs LSM 510 META, Zeiss, Jena, verwendet. Es wurde entweder ein 40x / 1,3 Oil Plan-Neofluar-Objektiv oder ein 63x / 1,4 Oil Plan-Apochromat-Objektiv benutzt. Für die Detektion des Alexa Fluor[®] 488-markierten Proteins wurde bei 488 nm (Argon-Laser) angeregt und die emittierte Fluoreszenzstrahlung mit einem 505-530 nm Bandpass-Filter detektiert. Für die DAPI-Färbung wurde bei 405 nm (UV-Laserdiode) angeregt und mit einem 420-480 nm Bandpass detektiert. Im Fall von Alexa Fluor[®] 594-markiertem Protein wurde bei 543 nm (Helium-Neon-Laser) angeregt und bei 592-667 nm detektiert.

2.9 Statistische Analysen

Die Ergebnisse der Versuche wurden als Mittelwert von mindestens 3 unabhängigen Messungen unter Angabe des Mittleren Standardfehlers (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung eines ungepaarten, zweiseitigen Student's T-Tests mit ungleicher Varianz. Dabei wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3 ERGEBNISSE

3. 1 Modulation des Glucocorticoid-induzierten elektrogenen Na⁺-Transports durch pro-inflammatorische Zytokine

Im Folgenden wird die Charakterisierung des modulatorischen Einflusses von pro-inflammatorischen Zytokinen auf die resorptionssteigernden Eigenschaften von Glucocorticoiden (GC) im Colon dargestellt. Dabei wird zunächst die Wechselwirkung des bei CED zentralen Zytokins TNF- α und synthetischen GC im Hinblick auf die Induktion des elektrogenen Na⁺-Transports via ENaC im distalen Colon der Ratte charakterisiert (Abschnitt 3. 1. 1). Weiterführende Analysen der zugrunde liegenden Mechanismen erfolgen unter Verwendung der humanen Colonzelllinie HT-29/B6-GR, die stabil mit den Glucocorticoid Rezeptor (GR) transfiziert wurde (Abschnitt 3. 1. 2). Die Charakterisierung des Einflusses weiterer bei CED relevanter Zytokine wird in Abschnitt 3. 1. 7 dargestellt.

3. 1. 1 Regulation des ENaC durch TNF- α und Dexamethason im distalen Rattencolon

Während der Antagonismus von TNF- α und GC im Hinblick auf die Immunantwort bei CED weitgehend charakterisiert ist, wurde ihr Zusammenspiel bezogen auf Na⁺-Transport und ENaC-Induktion bislang noch nicht analysiert. Aus diesem Grund wurde distales Colongewebe der Ratte auf die Induktion des ENaC-vermittelten Na⁺-Transport unter dem Einfluss von TNF- α und dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason untersucht. Dazu wurde total gestripptes Colonepithel aus Wildtyp-Ratten (Albino Wistar) in die Ussing-Kammer eingespannt, wobei hierbei der hintere als „late distal colon“ bezeichnete Bereich zwischen dem Lymphknoten des distalen Colons und dem Anus verwendet wurde (Fromm *et al.*, 1993). Während der gesamten Versuchsdauer wurden die elektrophysiologischen Parameter Kurzschlussstrom (I_{SC}) und transepithelialer Widerstand (R^t , Totalwiderstand der Darmwand) aufgezeichnet. R^t lieferte dabei auch eine Aussage über Viabilität/Integrität der Gewebstücke. Er sollte im distalen Rattencolon physiologischerweise $\sim 150 \Omega \text{ cm}^2$ betragen. Es erfolgte eine Zugabe von Dexamethason (1 μM , mukosal und serosal) oder TNF- α (10 000 U/ml, serosal) oder einer Kombination beider Reagenzien über eine Inkubationsdauer von 14 h. Zur Steigerung der TNF- α -Sensitivität des Gewebes über eine Erhöhung der TNF-Rezeptor-Expression ging eine Vorinkubation mit IFN- γ (1000 U/ml) für 1 h voraus (Wang *et al.*, 2006a). Der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport wurde am Ende des Versuchs durch die mukosale Zugabe des spezifischen ENaC-Blockers Amilorid (10^{-4} M) ermittelt und zwar aus der sich ergebenden Differenz des Kurzschlussstroms (ΔI_{SC}) vor und nach Amiloridgabe. In Abb. 3. 1 A ist der Zeitverlauf des Kurzschlussstroms I_{SC} anhand eines repräsentativen

Experiments exemplarisch dargestellt. Wie aus Abb. 3. 1 B ersichtlich, zeigte sich unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von TNF- α keine Induktion eines signifikanten Amilorid-sensitiven ΔI_{SC} . Im Gegensatz dazu induzierte die Inkubation mit Dexamethason ein ΔI_{SC} von $15,6 \pm 0,8 \mu\text{mol h}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Überraschenderweise resultierte die Koinkubation von Dexamethason und TNF- α in einer synergistischen Steigerung des ENaC-vermittelten Na^+ -Transports auf $21,4 \pm 1,2 \mu\text{mol h}^{-1} \text{cm}^{-2}$.

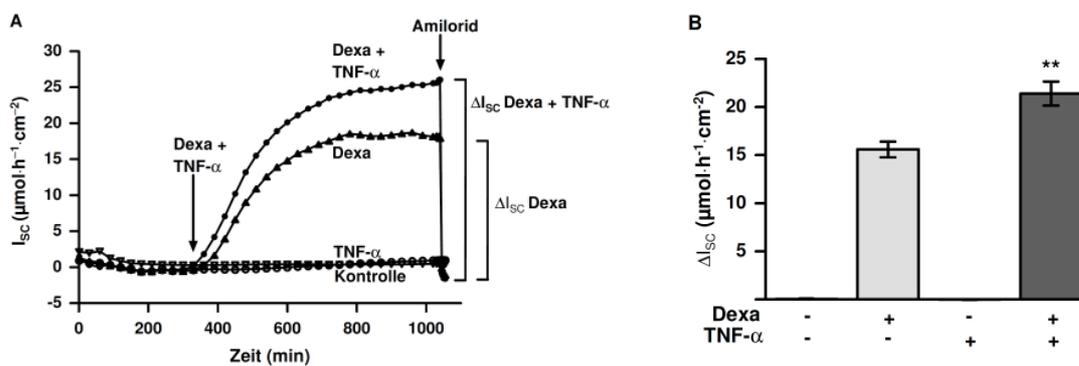


Abb. 3. 1: Einfluss von Dexamethason und TNF- α auf den elektrogenen Na^+ -Transport im distalen Colon der Ratte. (A) Zeitverlauf des Kurzschlussstroms I_{SC} . Distales Rattencolon wurde in die Ussing-Kammer eingespannt und mit Dexamethason (1 μM) und/oder TNF- α (10 000 U/ml) für 14 h nach einer Vorinkubation mit IFN- γ (1 h, 1000 U/ml) inkubiert. Die ENaC-vermittelte Na^+ -Resorption wurde aus dem Abfall des I_{SC} innerhalb von 10 min nach mukosaler Zugabe von Amilorid (10^{-4} M) ermittelt. Gezeigt ist eines von 11 Experimenten, die vergleichbare Resultate lieferten. (B) ENaC-vermittelter elektrogenen Na^+ -Transport. Wie für (A) beschrieben wurde distales Rattencolonepithel inkubiert. Gezeigt ist der MW \pm SEM, n=11, **p<0,01 verglichen mit Dexamethason-Behandlung.

Dieses Ergebnis war angesichts der bekannten TNF- α -abhängigen Inhibition des Mineralocorticoid-induzierten Na^+ -Transports über den ENaC unerwartet (Amasheh *et al.*, 2004, Barmeyer *et al.*, 2004a, Zeissig *et al.*, 2008). Allerdings konnte auch in dieser Versuchsserie die vorbeschriebene inhibitorische Wirkung auf die Aldosteron-abhängige Induktion des ENaC-vermittelten Na^+ -Transports in distalem Rattencolon erneut bestätigt werden (Abb. 3. 2). So zeigte sich nach einer 8-stündigen Inkubation mit Aldosteron (3 nM, serosal und mukosal) ein Amilorid-sensitiver I_{SC} von $9,99 \pm 1,28 \mu\text{mol h}^{-1} \text{cm}^{-2}$, der durch die 6-stündige serosale Vorinkubation mit 10 000 U/ml TNF- α (nach vorheriger serosaler Gabe von 1000 U/ml IFN- γ für 1h) inhibiert werden konnte. In Gegenwart von TNF- α betrug ΔI_{SC} $0,83 \pm 0,90 \mu\text{mol h}^{-1} \text{cm}^{-2}$.

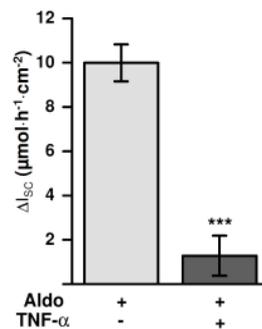


Abb. 3. 2: Einfluss von Aldosteron und TNF- α auf den elektrogenen Na⁺-Transport im distalen Colon der Ratte. Distales Rattencolonepithel wurde in die Ussing-Kammer eingespannt und mit TNF- α (10 000 U/ml) für 6 h nach einer Vorinkubation mit IFN- γ (1 h, 1000 U/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Aldosteron (3 nM) für 8 h und dann wie in Abb. 3. 1 beschrieben die Ermittlung der ENaC-vermittelten Na⁺-Resorption. Gezeigt sind MW \pm SEM, n=5, ***p<0,001 verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

Um die zugrunde liegenden Mechanismen des synergistischen Effekts von Dexamethason und TNF- α näher zu charakterisieren, wurde das distale Rattencolongewebe nach Versuchsende aus der Ussing-Kammer entnommen und zur Isolierung von Gesamt-RNA verwendet. Anschließend erfolgte eine Analyse der mRNA-Expression der ENaC-Untereinheiten α , β und γ mithilfe von Real-time RT-PCR. Während sich für α -ENaC keine Änderung des mRNA-Expressionsniveaus zeigte, war die Expression von β - und γ -ENaC nach Inkubation mit Dexamethason gesteigert. Diese Steigerung wurde durch die zusätzliche Anwesenheit von TNF- α signifikant verstärkt (Abb. 3. 3 A-C). Im Vergleich zur Kontrolle vergrößerte sich das Expressionsniveau des β -ENaC von 275 ± 24 -fach nach Dexamethason auf 397 ± 46 -fach nach Dexamethason plus TNF- α . Für den γ -ENaC steigerte sich die Expression von 1557 ± 137 auf 2239 ± 241 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei einer statistischen Analyse der Korrelation des ermittelten Amilorid-sensitiven I_{SC} des jeweiligen Gewebes und des dazugehörigen mRNA-Expressionsniveaus der ENaC-Untereinheiten zeigte sich eine eindeutige Korrelation für die Expression von β - und γ -ENaC (Abb. 3. 3 D-F). Hier lag das Bestimmtheitsmaß R^2 für β -ENaC bei 0,76 und für γ -ENaC bei 0,84. Keine positive Korrelation ergab sich für α -ENaC ($R^2=0,18$). Auf diese Weise konnte bestätigt werden, dass der beobachteten Steigerung des Amilorid-sensitiven elektrogenen Na⁺-Transports eine verstärkte Expression der ENaC-Untereinheiten β und γ zugrunde lag.

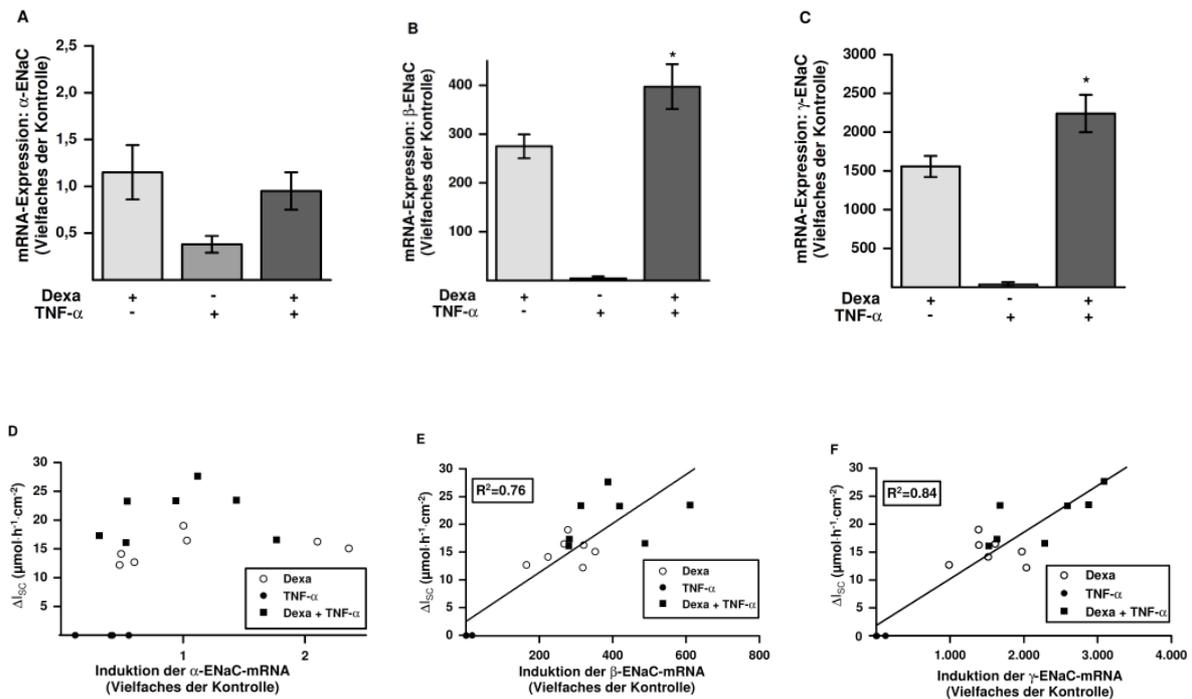


Abb. 3. 3: Analyse des mRNA-Expressionsniveaus der ENaC-Untereinheiten α , β und γ in Dexamethason/TNF- α -behandeltem distalen Rattencolon. Real-time RT-PCR der mRNA von (A) α -ENaC, (B) β -ENaC und (C) γ -ENaC. Distales Rattencolon wurde wie in Abb. 3. 1 beschrieben inkubiert. Nach der Ermittlung des ΔI_{SC} wurde Gesamt-RNA aus den Geweben isoliert und eine Real-time RT-PCR durchgeführt. Die Expression des *Housekeeping*-Gens GAP-DH wurde zur Normalisierung herangezogen. Gezeigt sind MW \pm SEM des Vielfachen der Induktion der mRNA-Expression des jeweiligen Gens gegenüber der Kontrolle (n=7, *p<0,05 verglichen mit Dexamethason).

3. 1. 2 Regulation des ENaC durch TNF- α und Dexamethason in humanen Colonzellen

Um die TNF- α -vermittelte Modulation des GC-induzierten Na⁺-Transports näher zu charakterisieren und um die häufige Verwendung tierischer Gewebe zu vermeiden, erfolgte die weitere Analyse am humanen Colonzellmodell HT-29/B6-GR. Der ursprünglich aus der humanen Colonicarcinomzelllinie HT-29 hervorgegangene Zellklon HT-29/B6 wurde durch Kultivierung in Glucose-freiem Medium erhalten (Kreusel *et al.*, 1991). Diese Zellen bilden hoch-differenzierte und polarisierte Epithelzellmonolayer aus, die sich durch einen hohen transepithelialen Widerstand sowie die Ausbildung von Tight Junctions, eines apikalen Bürstensaums und durch Mucusproduktion auszeichnen. Dass HT-29-Zellen defizient für den GR und den MR sind, erklärt ihr fehlendes Ansprechen auf Aldosteron oder GC in Hinblick auf die Induktion von ENaC-vermitteltem Na⁺-Transport (Mick *et al.*, 2001). Dies wurde durch die stabile Transfektion von HT-29/B6-Zellen mit dem Glucocorticoidrezeptor überwunden (Zeissig *et al.*, 2006). Der GR-exprimierende Zellklon HT-29/B6-GR konnte

daher für die Studie des Einflusses von TNF- α auf den GC-induzierten elektrogenen Na⁺-Transport herangezogen werden. So wurden konfluente Monolayer von HT-29/B6-GR-Zellen, die auf permeablen Zellkulturfiltern ausgesät worden waren, nach einer Wachstumsphase von 7 Tagen für 24 h unter hormonfreien Bedingungen kultiviert. Dies wurde durch den Ersatz des FCS im Medium durch Aktivkohle-behandeltes und dadurch hormonfreies FCS erreicht. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Dexamethason (1 μ M) oder TNF- α (10 000 U/ml) oder einer Kombination von beiden für 24 h. Für die Ermittlung des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports am Ende dieser Versuchsperiode wurden die Zellen auf den Zellkulturfiltern in die Ussing-Kammer eingespannt. Nach einer Äquilibrierungsphase von ca. 30 min, in denen der transepitheliale Widerstand ein stabiles Niveau erreichte (\sim 500 Ω ·cm²), wurde auch hier durch die apikale Zugabe von Amilorid (10⁻⁴ M) aus der sich ergebenden Differenz des Kurzschlussstroms (ΔI_{SC}) vor und nach Amiloridgabe der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport ermittelt.

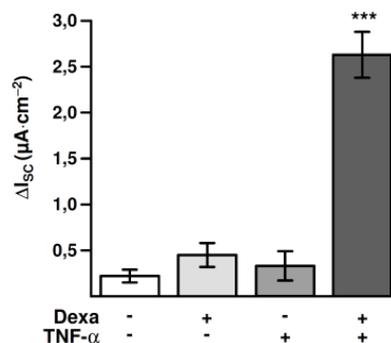


Abb. 3. 4: Einfluss von Dexamethason und TNF- α auf den elektrogenen Na⁺-Transport in HT-29/B6-GR-Zellen. Konfluente, auf Filtern gewachsene Monolayer von HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 h mit Dexamethason (1 μ M) und/oder TNF- α (10 000 U/ml) inkubiert. Die ENaC-vermittelte Na⁺-Resorption wurde aus dem Abfall des I_{SC} innerhalb von 10 min nach apikaler Zugabe von Amilorid (10⁻⁴ M) ermittelt. Gezeigt ist MW \pm SEM, n=6, ***p<0,001 verglichen mit Dexamethason-Inkubation.

Wie aus Abb. 3. 4 ersichtlich konnte im Colonzellkulturmodell der HT-29/B6-GR-Zellen der synergistische Effekt von TNF- α und Glucocorticoiden auf die Induktion des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports bestätigt werden. Hier zeigte sich nach Inkubation mit Dexamethason eine Tendenz des ΔI_{SC} zu einer Steigerung, die allerdings kein statistisch signifikantes Niveau erlangte ($0,45 \pm 0,13 \mu$ A/cm²). Die Inkubation mit TNF- α allein steigerte nicht den Amilorid-sensitiven Kurzschlussstrom. Allerdings induzierte die kombinierte Gabe beider Reagenzien eine starke Erhöhung des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports auf $2,63 \pm 0,25 \mu$ A/cm².

Auch bei HT-29/B6-GR-Zellen erfolgte eine RNA-Isolation nach Versuchsende und eine anschließende Analyse des mRNA-Niveaus der ENaC-Untereinheiten per Real-time RT-PCR. Verglichen mit dem distalen Colon der Ratte zeigte sich hier ein sehr ähnliches Bild;

während die α -Untereinheit des ENaC keine signifikante Änderung unter dem Einfluss von Dexamethason und TNF- α erfuhr, steigerte sich die Expression von β - und γ -ENaC im Vergleich zur Inkubation mit Dexamethason stark (Abb. 3. 5). Dabei erreichte die mRNA-Expression des β -ENaC einen Wert von 170 ± 18 -fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle, bei γ -ENaC lag der Wert bei 1164 ± 249 -fach.

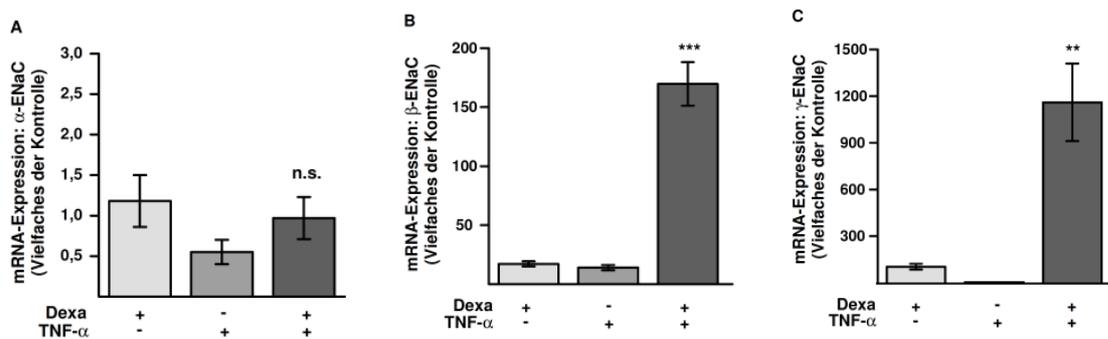


Abb. 3. 5: Analyse des mRNA-Expressionsniveaus der ENaC-Untereinheiten α , β und γ in Dexamethason/TNF- α -behandelten HT-29/B6-GR-Zellen. Auf Filtern gewachsene, konfluente HT-29/B6-GR Zellen wurden für 24 h mit Dexamethason ($1\mu\text{M}$) und/oder TNF- α ($10\ 000\ \text{U/ml}$) inkubiert. Nach RNA-Isolation wurde per Real-time RT-PCR das mRNA-Expressionsniveau von α -, β - und γ -ENaC untersucht. Die Expression des *Housekeeping*-Gens GAP-DH wurde zur Normalisierung herangezogen. Gezeigt sind MW \pm SEM des Vielfachen der Induktion der mRNA-Expression des jeweiligen Gens gegenüber der Kontrolle ($n=9$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ und n.s. verglichen mit Dexamethason).

Eine Analyse der ENaC-Expression auf Proteinniveau ergab, dass in Übereinstimmung mit den Daten zur mRNA-Expression auch eine Steigerung des β -ENaC auf Proteinniveau nachweisen ließ (Abb. 3. 6).

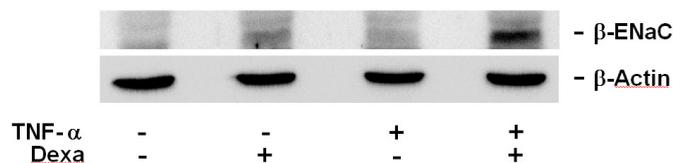


Abb. 3. 6: Western Blot-Analyse des β -ENaC. Die Expression des β -ENaC-Proteins ($\sim 60\ \text{kDa}$) wurde in HT-29/B6-GR-Lysaten nach einer Inkubation mit Dexamethason ($1\mu\text{M}$) und/oder TNF- α ($10\ 000\ \text{U/ml}$) für 24 h analysiert. Pro Spur wurden $100\ \mu\text{g}$ Protein aufgetragen. Humanes β -Actin ($\sim 42\ \text{kDa}$) diente als Ladekontrolle.

Für den Nachweis des γ -ENaC mittels Immunodetektion mangelte es an einem funktionsfähigen Antikörper. Aus diesem Grund beschränkte sich der Proteinnachweis per Western Blot auf die ENaC-Untereinheit β .

3. 1. 3 Charakterisierung von ENaC-Promotoraktivität und Glucocorticoid-rezeptor (GR)-Transaktivierung

In Abhängigkeit von der Ligandenbindung kann der GR nach Dissoziation von cytosolischen Chaperonen in den Zellkern translozieren und dort im dimerisierten Zustand über die Bindung an *Glucocorticoid Response Elements* (GRE) auf der DNA die Transaktivierung bestimmter Gene beeinflussen. Um die zugrunde liegenden Mechanismen der Induktion der mRNA-Expression von β - und γ -ENaC aufzuklären, wurde analysiert, ob eine Abhängigkeit der transkriptionellen ENaC-Induktion unter dem Einfluss von Dexamethason und TNF- α von der Bindung des GR an GREs bestand. Es wird angenommen, dass die Glucocorticoid-induzierte Transkription von β - und γ -ENaC im Colon von der Bindung des GR an ein gemeinsames GRE verursacht wird, das in einiger Entfernung von der proximalen Promotorregion beider Gene liegt (Thomas *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde zunächst die Aktivität der Promotorbereiche von β - und γ -ENaC im Reporteragen-Assay in HT-29/B6-GR-Zellen getestet. Dabei wurden transiente Transfektionen mit Plasmiden durchgeführt, welche für *Firefly*-Luciferase in Abhängigkeit der jeweiligen ENaC-Promotorbereiche kodierten (Abb. 3. 7). Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde simultan mit dem für *Renilla*-Luciferase kodierenden Koreporter pGL4.70 transfiziert. Es zeigte sich, dass in Übereinstimmung mit der oben genannten Annahme keine Dexamethason- und/oder TNF- α -abhängige Induktion der Luciferase-Expression in Abhängigkeit von einem *full-length* (-2926 bis +35, Abb. 3. 7B) oder einem 5'-verkürzten (-459 bis +35, Daten nicht gezeigt) Promotorbereich des humanen γ -ENaC beobachtet werden konnte. Auch für ein β -ENaC-Promotorkonstrukt (-1137 bis +200) wurde keine Steigerung der Luciferase-Expression nachweisbar (Abb. 3. 7A). In diesem Fall kam es unter dem Einfluss von Dexamethason und TNF- α sogar zu einer geringfügigen Herabregulation der Luciferase-Aktivität gegenüber der Inkubation mit Dexamethason allein.

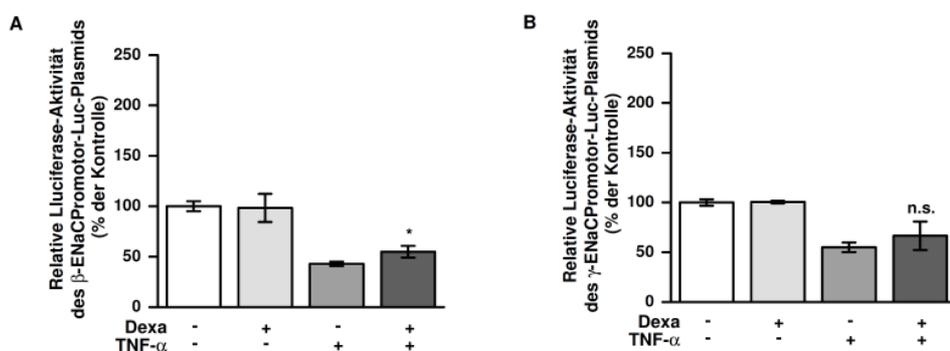


Abb. 3. 7: Genreporter-Assay in HT-29/B6-GR-Zellen: Promotoraktivität von β - und γ -ENaC. (A) HT-29/B6-GR-Zellen wurden transient mit pbhENaC-A (β -ENaC-Promotor-Luciferase; -1137 to +200) transfiziert und für 24 h mit Dexamethason (1 μ M) und/oder TNF- α (10 000 U/ml) inkubiert. Die Ergebnisse stellen die normalisierte relative Luciferase-Aktivität dar. Gezeigt sind die MW \pm SEM (n=4, *p<0,05 verglichen

mit Dexamethason). (B) HT-29/B6-GR-Zellen wurden transient mit pghENaC-A (γ -ENaC-Promotor-Luciferase; -2926 to +35) transfiziert und für 24 h mit Dexamethason (1 μ M) und/oder TNF- α (2500 U/ml) inkubiert. Die Ergebnisse stellen die normalisierte relative Luciferase-Aktivität dar. Gezeigt sind die MW \pm SEM (n=2, n.s. verglichen mit Dexamethason).

Im Folgenden wurde daher der Einfluss von Dexamethason und TNF- α auf HT-29/B6-GR-Zellen untersucht, die transient mit einem Plasmid transfiziert wurden, das für *Firefly*-Luciferase unter der Kontrolle eines GRE-Promotors kodierte. Mithilfe dieses Konstrukts konnte das Ausmaß der Transaktivierung durch den GR in dem betreffenden Zellsystem analysiert werden. Wie erwartet zeigte sich eine Induktion der GRE-abhängigen Luciferase-Expression durch die Inkubation mit Dexamethason (1689 \pm 109 %), während TNF- α zu keiner Verstärkung führte (Abb. 3. 8). Die Kombination von Dexamethason und TNF- α führte allerdings zu einer stärkeren Induktion als Dexamethason allein (3476 \pm 303 %).

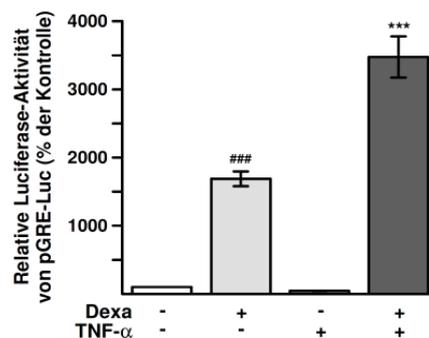


Abb. 3. 8: Reporteragen-Assay in HT-29/B6-GR-Zellen: GRE-abhängige Luciferase-Expression unter Dexamethason und/oder TNF- α . HT-29/B6-GR-Zellen wurden transient mit pGRE-Luc transfiziert und für 24 h mit Dexamethason (1 μ M) und/oder TNF- α (10 000 U/ml) inkubiert. Die Ergebnisse stellen die normalisierte relative Luciferase-Aktivität dar. Gezeigt sind die MW \pm SEM (n=6, ***p<0,001 verglichen mit Dexamethason, ^{###}p<0,001 verglichen mit unbehandelter Kontrolle).

Aufgrund dieser Beobachtung kann angenommen werden, dass die synergistische Induktion der β - und γ -ENaC-Transkription durch die Kombination von Dexamethason und TNF- α über GREs vermittelt wird, welche nicht innerhalb, sondern weiter entfernt auf- oder abwärts von der proximalen Promotorregion gelegen sind.

Um sicherzustellen, dass der beobachtete synergistische Effekt tatsächlich auf einer GR-vermittelten Transaktivierung beruhte, wurde der GR-Antagonist RU-486 verwendet. Wie aus Tab. 3. 1 ersichtlich, wurde sowohl die Induktion des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports als auch der synergistische Anstieg der GR-Transaktivierung durch eine Vorinkubation mit RU-486 blockiert.

Tabelle 3. 1 : Inhibition der Dexamethason- und TNF- α -vermittelten Effekte durch RU-486.

	ΔI_{SC} ($\mu A \cdot cm^{-2}$)	Relative Luciferase-Aktivität (pGRE-Luc; % der Kontrolle)
Kontrolle	0,49 \pm 0,07	100
Dexamethason	0,63 \pm 0,12	1920 \pm 77
Dexamethason + TNF- α	3,07 \pm 0,20	3371 \pm 399
Dexamethason + TNF- α + RU-486	0,46 \pm 0,07 ***	23 \pm 1 ***

Zur Messung des Amilorid-sensitiven I_{SC} wurden HT-29/B6-GR-Zellen mit dem GR-Antagonisten RU-486 (10 μM) für 1 h vorinkubiert. Anschließend wurden Dexamethason (1 μM) und/oder TNF- α (10 000 U/ml) zugegeben und für 24 h inkubiert. Um die GR-abhängige Transaktivierung zu charakterisieren, wurden HT-29/B6-GR-Zellen mit pGRE-Luc transfiziert und ebenfalls für 1 h mit RU-486 (10 μM) inkubiert, bevor Dexamethason (1 μM) und/oder TNF- α (10 000 U/ml) für 24 h zugefügt wurden. Angegeben sind die MW \pm SEM (n=6, ***p<0,001 verglichen mit Dexamethason + TNF- α).

3. 1. 4 Proteinexpression und subzelluläre Lokalisation des GR

Der Steigerung der GRE-abhängigen Transaktivierung durch den GR in Abhängigkeit von Dexamethason und TNF- α könnten einerseits eine Änderung des Transaktivierungspotentials und andererseits eine Änderung im Expressionsniveau des GR zugrunde liegen. Im Folgenden wurden daher konfluente HT-29/B6-GR-Zellen für verschiedene Inkubationszeiten mit Dexamethason in An- oder Abwesenheit von TNF- α stimuliert, und anschließend wurde Gesamtzelllysat präpariert. Es erfolgte eine Analyse der GR-Gesamtexpression auf Proteinebene nach einer Inkubationsdauer von 1, 3 und 6 h. Wie aus Abbildung 3. 9 ersichtlich war die Gesamtexpression des GR-Proteins in Gegenwart von TNF- α im Vergleich zur Dexamethason-behandelten Probe schon nach 1 h gesteigert. Diese Steigerung erreichte nach einer Inkubationsdauer von 3 h ein Maximum und fiel nach 6 h wieder ab.

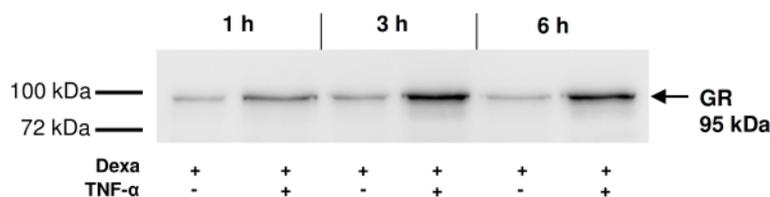


Abb. 3. 9: Western Blot-Analyse des GR-Gesamtproteingehalts in HT-29/B6-GR-Zellen: Zeitverlauf nach Stimulation mit Dexamethason und TNF- α . Konfluente, auf Filtern gewachsene HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 1, 3 und 6 h mit Dexamethason (1 μM) +/- TNF- α (10 000 U/ml) stimuliert. Nach der Präparation von Gesamtzelllysat wurden 40 μg Protein pro Spur aufgetragen. Dann erfolgte eine Western Blot-Analyse der GR-Gesamtproteinexpression.

Eine anschließende detaillierte Charakterisierung des GR-Proteinniveaus nach einer Inkubationsdauer von 3 h ergab, dass in Gegenwart von TNF- α ein Anstieg des GR auf 251 ± 40 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auftrat (Abb. 3. 10). Durch die gleichzeitige Anwesenheit von Dexamethason zeigte sich keine weitere Steigerung dieses Werts (283 ± 44 %). Aus diesem Grund ist auf eine von GC-unabhängige Steigerung des GR-Proteinlevels durch TNF- α zu schließen.

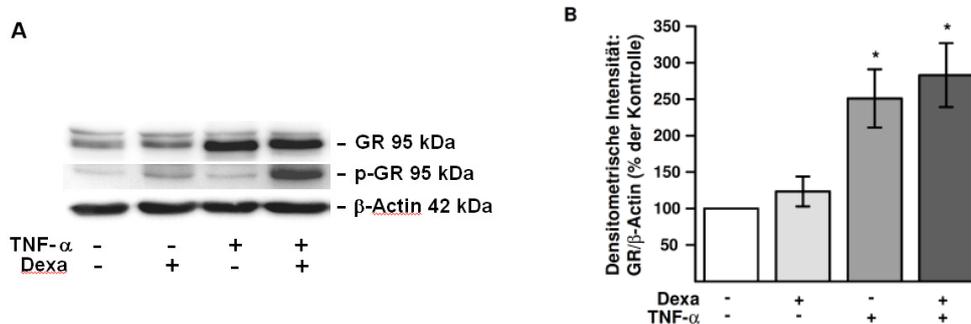


Abb. 3. 10: Western Blot-Analyse des Gesamtproteingehalts von GR und p-GR in HT-29/B6-GR-Zellen. Konfluente, auf Filtern gewachsene HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 3 h mit Dexamethason (1 μ M) und/oder TNF- α (10 000 U/ml) stimuliert. (A) In Gesamzelllysaten wurde per Western Blot die Expression von Gesamt-GR und p-GR (p-Ser211) charakterisiert. β -Actin diente als Ladekontrolle. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot. (B) Densitometrische Analyse des Gesamt-GR-Proteinniveaus normalisiert auf β -Actin. Gezeigt ist der MW \pm SEM, n=4, *p<0,05 verglichen mit Dexamethason.

Der Frage, ob zusätzlich eine Änderung des Transaktivierungspotentials des GR unter dem Einfluss von Dexamethason und TNF- α auftrat, wurde durch die Charakterisierung des Phosphorylierungsstatus des GR auf den Grund gegangen. Die Untersuchung post-translationaler Modifikationen durch Wang *et al.* wies eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der GC-induzierten Phosphorylierung des humanen GR an Position Serin 211 und der Transaktivierung durch den GR nach (Wang *et al.*, 2002). Im Unterschied zur Phosphorylierung an der Position Serin 203 wurde für an Serin 211 phosphorylierten GR eine vorrangig nukleäre Lokalisation nachgewiesen. Es konnte außerdem entsprechend der subzellulären Lokalisation eine Korrelation zwischen der Ser 211-Phosphorylierung und einer GR-Transaktivierung demonstriert werden, die so nicht für andere GC-abhängig phosphorylierte Aminosäurereste (Ser203) im Protein auftrat. Weiter wurde mittels ChIP-Assay gezeigt, dass eine Bindung des GR an GEs in den Promotoren bekannter GC-induzierter Gene stattfand, sofern dieser an Ser211 oder Ser226 phosphoryliert war, nicht aber an Ser203 (Blind & Garabedian, 2008). Aus diesem Grund kann die Detektion einer Phosphorylierung des GR an Position 211 als eine Bestätigung der GR-Aktivierung angesehen werden. Im Rahmen dieses Projektes wurde der Status der Ser 211-

Phosphorylierung per Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 3. 10 A). In HT-29/B6-GR-Zellen zeigte sich eine Phosphorylierung des GR an Ser 211 in Abhängigkeit von Dexamethason, die nicht durch TNF- α beeinflusst wurde. Dies ergab sich aus der densitometrischen Analyse des Verhältnisses zwischen phosphoryliertem GR und dem Gesamt-GR-Niveau, die keine Veränderung dieses Verhältnisses ergab, unabhängig davon, ob die Zellen mit Dexamethason allein oder in Kombination mit TNF- α inkubiert wurden.

Als Schlussfolgerung aus dieser Beobachtung ergab sich daher eine Induktion der Gesamtlevels an GR-Protein als Hauptwirkung von TNF- α , während der Anteil an aktiviertem Rezeptor keiner Veränderung unterlag. Dieses Ergebnis konnte durch eine Immunfluoreszenzfärbung des GR und konfokale Laser Scanning-Mikroskopie bestätigt werden. Auch hier wurden HT-29/B6-GR-Zellen für 3 h mit Dexamethason und/oder TNF- α inkubiert (Abb. 3. 11).

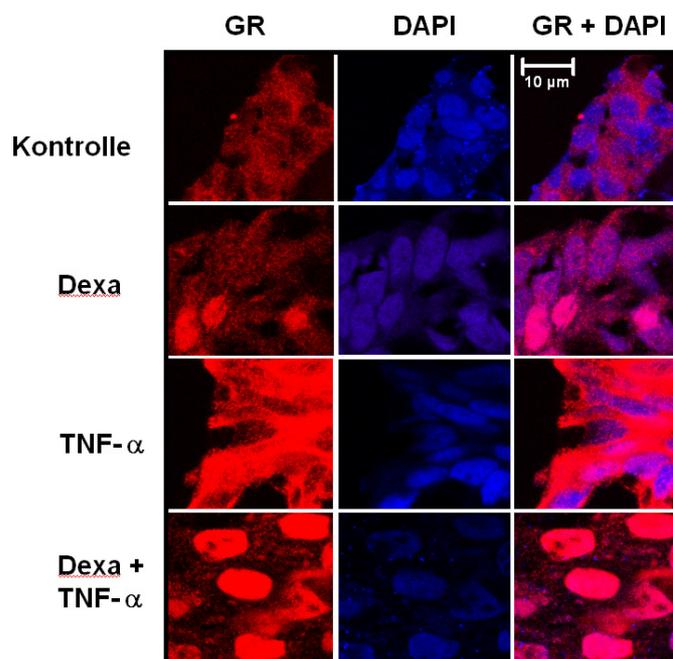


Abb. 3. 11: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie des GR. HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 3 h mit Dexamethason (1 μ M) und/oder TNF- α (10 000 U/ml) inkubiert und anschließend einer Immunfluoreszenzfärbung mit anti-GR-Antikörper (rot) unterzogen. Eine Kernfärbung erfolgte unter Verwendung von DAPI (blau). Die mikroskopische Analyse erfolgte unter Verwendung eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.

Während die GR-Immunfluoreszenzfärbung wie erwartet nach Stimulation mit Dexamethason eine nukleäre Lokalisation des GR aufzeigte, verstärkte die Inkubation mit TNF- α allein die Intensität des cytoplasmatischen GR-Signals und zeigte keine nukleäre Lokalisation. Allerdings zog die kombinierte Inkubation mit Dexamethason und TNF- α ein starkes nukleäres GR-Signal nach sich. Aufgrund der TNF- α -induzierten GR-Expressionssteigerung und der Dexamethason-abhängigen nukleären Translokation ergab

sich ein verstärktes nukleäres GR-Signal im Vergleich mit der Inkubation mit Dexamethason allein.

3. 1. 5 Regulation von mRNA-Niveau und -Halblebenszeit des GR- α durch TNF- α

Ob die Induktion des GR-Gesamtproteingehalts auf einer Steigerung der GR-mRNA beruhte oder nicht, wurde mittels der Charakterisierung des Niveaus an GR- α -mRNA analysiert. Dazu wurden HT-29/B6-GR-Zellen für 3 h mit Dexamethason und/oder TNF- α stimuliert. Nach RNA-Isolation wurde per Real-time RT-PCR der Gesamtgehalt an GR- α -mRNA bestimmt (Abb. 3. 12).

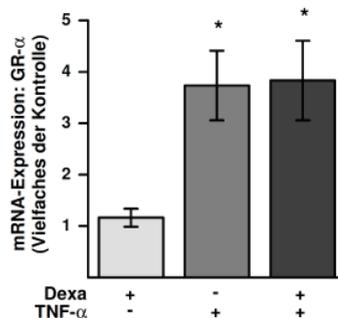


Abb. 3. 12: mRNA-Expression des GR- α in HT-29/B6-GR-Zellen: Einfluss von Dexamethason und TNF- α . Konfluente, auf Filtern gewachsene HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 3 h mit Dexamethason (1 μ M) und/oder TNF- α (10 000 U/ml) stimuliert. Nach RNA-Isolation wurde das Expressionsniveau der GR- α -mRNA per Real-time RT-PCR untersucht. Die Expression des *Housekeeping*-Gens GAP-DH wurde zur Normalisierung herangezogen. Gezeigt sind MW \pm SEM des Vielfachen der Induktion der mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle (n=4, *p<0,05 verglichen mit Dexamethason).

Die Real-time RT-PCR-Analyse wies nach Inkubation mit Dexamethason und TNF- α eine Steigerung des Expressionsniveaus von GR- α nach (3,83 \pm 0,78-fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle), die sich als unabhängig von der Anwesenheit von Dexamethason darstellte. Auch führte Dexamethason allein zu keiner Änderung des GR- α -mRNA-Niveaus. Weil der GR im Falle der HT-29/B6-GR-Zellen mittels stabiler Transfektion in die Zellen eingebracht wurde und seine konstitutive Expression durch den Cytomegalie-Virus (CMV)-Promotor des Plasmids pcDNA3.1(+) gesteuert wird, ist eine Beeinflussung der GR-Transkription durch TNF- α unwahrscheinlich. Dennoch bedurfte es der Überprüfung, ob die Aktivität des CMV-Promotors in HT-29/B6-GR-Zellen durch TNF- α verändert wurde. Dazu wurden die Zellen transient mit dem ursprünglich zur GR-Transfektion genutzten pcDNA3.1(+)-Konstrukt transfiziert, bei dem der GR-kodierende Bereich durch Firefly-Luciferase ersetzt worden war (Abb. 3. 13 A). Wie erwartet änderten weder TNF- α noch Dexamethason oder deren Kombination die Luciferase-Expression, die vom CMV-Promotor kontrolliert wurde.

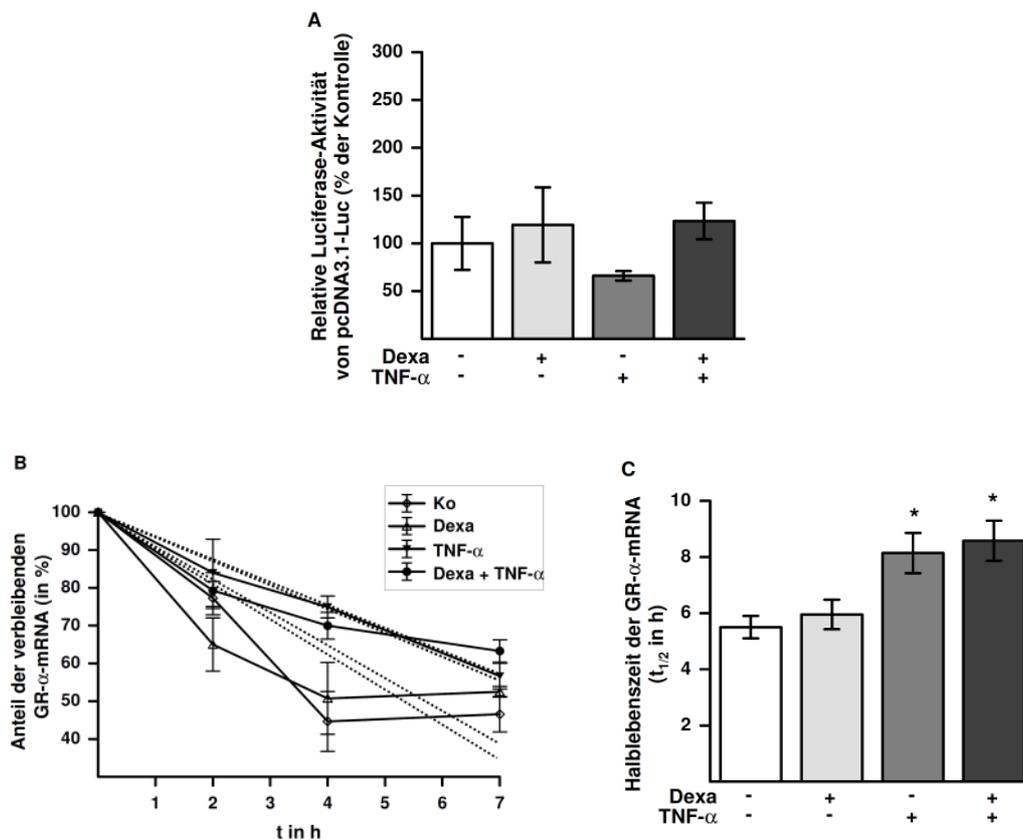


Abb. 3. 13: Einfluss von Dexamethason und TNF- α auf die Halblebenszeit der GR- α -mRNA. (A) Reportergen-Assay mit pcDNA3.1(+)-Luc. HT-29/B6-GR-Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-Luc transfiziert und für 24 h mit Dexamethason und/oder TNF- α inkubiert. Gezeigt ist die normalisierte relative Luciferase-Aktivität (MW \pm SEM, n=4). (B, C) Abnahme der Halblebenszeiten der GR- α -mRNA. Die mRNA-Synthese wurde in HT-29/B6-GR-Zellen durch Vorinkubation mit Actinomycin D (7 μ g/ml) für 1 h blockiert. Nach Zugabe von Dexamethason (1 μ M) und/oder TNF- α (10 000 U/ml) wurde nach 0, 2, 4 und 7 h Gesamt-RNA isoliert. Der Abbau der GR- α -mRNA wurde per Real-time RT-PCR quantifiziert. Gezeigt sind MW \pm SEM, unterbrochene Linien stellen die jeweiligen Regressionsgeraden dar (n=5, p<0.05 verglichen mit Dexamethason).

Aufgrund des Ausschlusses einer transkriptionellen Regulation des GR wurde im Folgenden der Einfluss von Dexamethason und TNF- α auf die Lebensdauer der mRNA des GR- α untersucht. Dazu wurde die Transkription in HT-29/B6-GR-Zellen durch Vorinkubation mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D blockiert und dann nach Zugabe von Dexamethason/TNF- α eine RNA-Isolation durchgeführt. Der Gehalt an GR- α -mRNA wurde mittels Real-time-PCR quantifiziert. Wie aus Abb. 3. 13 B ersichtlich verringerte sich dieser in den unbehandelten und den Dexamethason-stimulierten Zellen schneller als in den Zellen, die TNF- α oder seiner Kombination mit Dexamethason ausgesetzt worden waren. Die aus den jeweiligen Regressionsgeraden ermittelte Halblebenszeit der GR- α -mRNA wurde in Abb. 3. 13 C dargestellt und steigerte sich von $5,50 \pm 0,40$ h in unbehandelten und $5,95 \pm 0,53$ h in Dexamethason-behandelten Zellen auf $8,14 \pm 0,72$ h in Zellen, die mit TNF- α stimuliert

worden waren. Dieser Effekt war unabhängig von Dexamethason, da in Gegenwart beider Reagenzien keine weitere Steigerung der Halblebenszeit zu beobachten war. Somit konnte die Stabilisierung der GR- α -mRNA unter dem Einfluss von TNF- α als ursächlich für den Anstieg des Gesamtniveaus der mRNA des GR und der damit korrespondierenden Steigerung des GR-Proteinlevels identifiziert werden.

3. 1. 6 Charakterisierung der beteiligten TNF- α -abhängigen Signalwege

TNF- α kann seine Wirkung durch die Aktivierung einer Vielzahl verschiedener Signalwege entfalten. Hierbei können u.a. entweder TNF- α -induzierbare MAP-Kinasen eine Rolle spielen, aber auch der NF- κ B-Signalweg kann an der TNF- α -abhängigen Signaltransduktion teilhaben.

Nach der Beobachtung der TNF- α -induzierten Steigerung des GR-Gesamtniveaus in HT-29/B6-GR-Zellen bedurfte die Frage nach den in diesem Zellsystem beteiligten Signalwegen der Klärung. Dazu wurden im Rahmen dieses Projekts Versuche zum synergistischen Effekt von TNF- α und Dexamethason auf den elektrogenen Na⁺-Transport in Gegenwart spezifischer Inhibitoren durchgeführt. Zur Inhibition der MAP-Kinasen p38, JNK und MEK1/2 (MAP-Kinase-Kinase für p42/44 ERK) wurden die Inhibitoren SB202190, SP600125 bzw. U0126 eingesetzt. Weiter wurde für die Hemmung des NF- κ B-Wegs der I κ B- α -Kinase-Inhibitor BAY11-7082 verwendet. In der Analyse des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms (ΔI_{sc}) in HT-29/B6-GR-Zellen unter Dexamethason/TNF- α nach Vorinkubation mit den genannten Inhibitoren zeigte sich eine spezifische Inhibition der synergistischen Induktion des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports durch Dexamethason und TNF- α in Gegenwart des Hemmers der MAP-Kinase p38 (Abb. 3. 14).

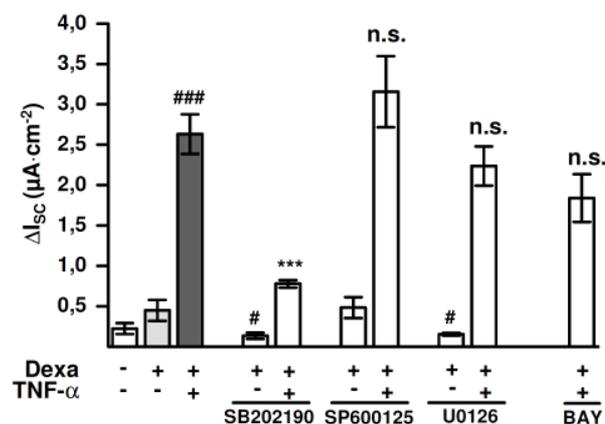


Abb. 3. 14: Amilorid-sensitiver Kurzschlussstrom in HT-29/B6-GR-Zellen unter Einfluss von Inhibitoren. Konfluente HT-29/B6-GR-Zellen wurden mit den angegebenen Inhibitoren (alle 10 μ M) für 1 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Dexamethason (1 μ M) und/oder TNF- α (10 000 U/ml) für 24 h. Der ENaC-

vermittelte Na⁺-Transport wurde durch die Zugabe von Amilorid (10⁻⁴ M) ermittelt. Gezeigt sind MW ± SEM, n≥6, ***p<0,001 und n.s. verglichen mit Dexamethason plus TNF-α, #p<0,05 und ###p<0,001 verglichen mit Dexamethason.

Der durch Dexamethason und TNF-α induzierte ENaC-vermittelte Na⁺-Transport von 2,63 ± 0,25 µA/cm² wurde durch Vorinkubation mit dem p38-Inhibitor SB202190 (10 µM) auf 0,77 ± 0,78 µA/cm² reduziert. Im Gegensatz dazu zeigte weder die Inhibition von JNK oder des p42/44 ERK-Signalwegs noch die des NF-κB-Signalwegs einen signifikanten Effekt.

Zur weiteren Überprüfung der Beteiligung der MAP-Kinase p38 an der ENaC-Induktion wurde die mRNA-Expression der ENaC-Untereinheiten unter dem Einfluss inhibitorischer Substanzen untersucht. Hier zeigte sich, dass die Expression der α-Untereinheit des ENaC keiner Veränderung unterlag (Daten nicht gezeigt). Auch die β-Untereinheit unterlag durch die Präsenz der genannten Inhibitoren keiner Herabregulation im Hinblick auf die Expression ihrer mRNA (Abb. 3. 15A). Die Inhibition der p38-MAPK und des NF-κB-Signalwegs führte hier zu keiner Änderung, bei der Hemmung des JNK- bzw. p42/44 ERK-Signalwegs kam es zu einer geringfügigen Steigerung der β-ENaC-mRNA.

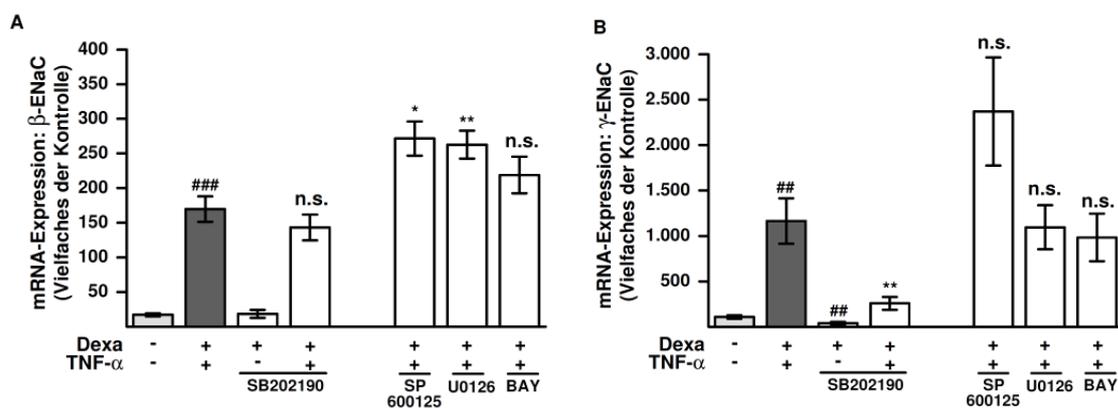


Abb. 3. 15: Induktion der mRNA-Expression von β- und γ-ENaC in HT-29/B6-GR-Zellen unter dem Einfluss von Inhibitoren. HT-29/B6-GR-Zellen wurden wie in Abb. 3. 14 beschrieben inkubiert. Nach Gesamt-RNA-Isolation wurde das Expressionsniveau von β- (A) und γ-ENaC-mRNA (B) per Real-time RT-PCR untersucht. Die Expression des *Housekeeping*-Gens GAP-DH wurde zur Normalisierung herangezogen. Gezeigt sind MW ± SEM der x-fachen Induktion der mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle (n=6, ##p<0,01 und ###p<0,001 verglichen mit Dexamethason; *p< 0,05, **p<0,02 und n.s. verglichen mit Dexamethason plus TNF-α).

Im Gegensatz dazu ergab sich eine ausgeprägte Hemmung der Dexamethason/TNF-α-induzierten Steigerung des Expressionsniveaus der γ-ENaC-mRNA nach der Vorinkubation mit dem Inhibitor der MAP-Kinase p38 (Abb. 3.15B). Die Induktion der γ-ENaC-mRNA wurde in diesem Fall von 1163 ± 249-fach auf 159 ± 51-fach durch die Zugabe von SB202190 gesenkt. Weder die Inhibition von JNK oder MEK1/2 noch die des NF-κB-Signalwegs zeigten

hier einen signifikanten Effekt. Somit ist davon auszugehen, dass die Hemmung des durch Dexamethason/TNF- α hervorgerufenen, ENaC-vermittelten Na⁺-Transports durch p38 auf einer verminderten Induktion der γ -ENaC-Expression beruhte. Ob diese Inhibition auf eine verminderte GR-Expression oder auf Änderungen der post-translationalen Modifikationen des GR zurückzuführen war, sollte die folgende Western Blot-Analyse des GR-Proteinlevels und der Phosphorylierung des GR an Ser211 zeigen (Abb. 3. 16).

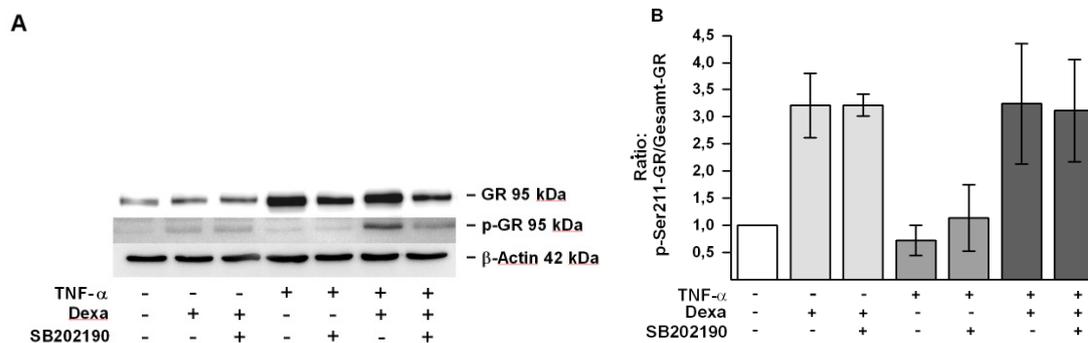


Abb. 3. 16: Analyse von Gesamtproteingehalt und Phosphorylierungsstatus des GR unter Inhibition der MAP-Kinase p38. HT/29/B6-GR-Zellen wurden für 1 h mit SB202190 (10 μ M) vorinkubiert, anschließend wurde Dexamethason (1 μ M) und/oder TNF- α (10 000 U/ml) zugegeben und nach 3 h Gesamtzelllysate präpariert. (A) Western Blot-Analyse des GR und p-Ser211-GR. β -Actin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist eins von drei unabhängigen Experimenten, die vergleichbare Resultate lieferten. (B) Densitometrische Analyse des Proteinverhältnisses p-Ser211-GR/Gesamt-GR. Gezeigt ist der MW \pm SEM (n=3).

Bezogen auf das Gesamtproteinniveau des GR minderte die Inhibition der MAP-Kinase p38 die durch TNF- α hervorgerufene Expressionssteigerung. Diese Beobachtung war unabhängig von der gleichzeitigen Präsenz von Dexamethason. Unter Berücksichtigung des erhaltenen Signals für an Position Serin 211 phosphorylierten GR zeigte sich, dass das Verhältnis von phosphoryliertem GR zu Gesamt-GR sich nicht änderte. So lag dieses Verhältnis in Dexamethason-behandelten Zellen bei $3,21 \pm 0,60$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen und wurde durch den Inhibitor nicht verschoben ($3,21 \pm 0,20$). Gleiches galt für Zellen, die mit der Kombination von Dexamethason und TNF- α inkubiert worden waren, da dort das Verhältnis ohne Inhibitor bei $3,24 \pm 1,11$ und in Gegenwart des Inhibitors bei $3,12 \pm 0,94$ lag. Es war daher auf eine Reduktion der TNF- α -abhängigen Steigerung des GR-Proteinniveaus durch die Inhibition der p38 zu schließen und nicht auf eine Reduktion der GR-Aktivierung.

Abschließend wurde die Spezifität des Inhibitors der MAP-Kinase p38 charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde die Aktivierung der drei MAP-Kinase-Signalwege sowie die Wirkung des Inhibitors auf diese Aktivierung analysiert. Da JNK nach Aktivierung eine Autophosphorylierung zeigt, konnte die Aktivität des Moleküls durch Western Blot-Analyse der phosphorylierten Form der JNK (phospho-Thr183/Tyr185) überprüft werden. Die Aktivität der MEK1/2 wurde anhand der Phosphorylierung ihres Substrats p42/44 ERK (phospho-

Thr202/Tyr204) charakterisiert und die der p38-MAPK anhand des Phosphorylierungsstatus ihres Substrats MAPKAPK-2 (phospho-Thr334) (Abb. 3. 17).

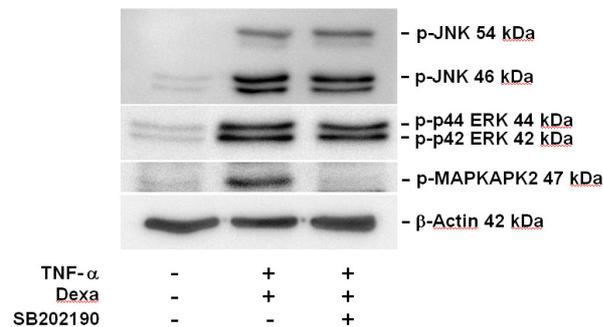


Abb. 3. 17: Inhibitor-Spezifität des MAP-Kinase p38-Inhibitors SB202190. Western Blot-Analyse von phospho-JNK, phospho-p42/44 ERK und phospho-MAPKAPK-2. HT-29/B6-GR-Zellen wurden mit SB202190 (10 μ M) für 1 h vorinkubiert, anschließend wurden Dexamethason (1 μ M) und TNF- α (10 000 U/ml) für 20 min zugegeben und Gesamtzelllysate präpariert. β -Actin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist eins von drei unabhängigen Experimenten, die vergleichbare Resultate lieferten.

Nach Stimulation durch TNF- α bei gleichzeitiger Anwesenheit von Dexamethason konnte eine Aktivierung der drei untersuchten MAP-Kinase-Signalwege anhand der Phosphorylierung der spezifischen Substratkinasen nachgewiesen werden. Die Vorinkubation mit SB202190 inhibierte allerdings ausschließlich die Phosphorylierung der MAPKAPK-2, dem Substrat der p38. Diese Beobachtung bestätigte die Spezifität des p38-Inhibitors SB202190.

3. 1. 7 Wechselwirkung weiterer bei CED relevanter Zytokine mit Glucocorticoid-vermittelten Effekten

Neben dem TNF- α -Niveau ist bei CED-Patienten auch der Spiegel weiterer relevanter Zytokine gesteigert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher für einige dieser Zytokine in ähnlicher Weise wie für TNF- α beschrieben ihr Effekt auf die Transaktivierung des GR bzw. auf die Induktion eines ENaC-vermittelten Na⁺-Transports in HT-29/B6-GR-Zellen untersucht. Dabei wurde die Wirkung des bei CU gesteigerten IL-13 sowie des bei MC erhöhten IFN- γ näher charakterisiert. Außerdem wurden die bei beiden Formen der CED vorhandenen Zytokine IL-8, IL-1 β und IL-6 analysiert (Abb. 3. 18).

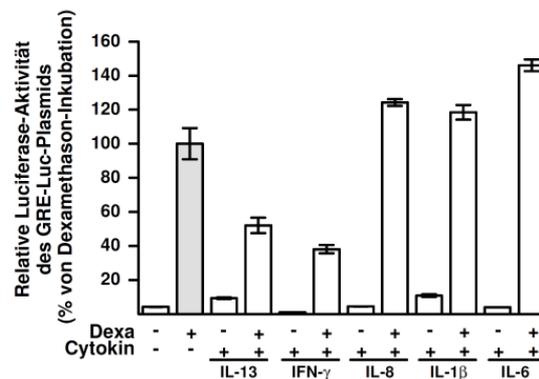


Abb. 3. 18: Einfluss verschiedener bei CED erhöhter Zytokine auf die GR-vermittelte Transaktivierung. HT-29/B6-GR-Zellen wurden transient mit pGRE-Luc transfiziert und für 24 h mit Dexamethason (1 μ M) und/oder IL-13 (100 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml), IL-8 (100 U/ml), IL-1 β (20 ng/ml) bzw. IL-6 (100 U/ml) inkubiert. Die Ergebnisse stellen die normalisierte relative Luciferase-Aktivität dar (n=2).

Unter dem Einfluss der genannten Zytokine zeigten sich verschiedene Effekte im Hinblick auf die Transaktivierung durch den GR, die im Reporter-gen-Assay über die GRE-kontrollierte Luciferase-Expression charakterisiert wurde. Während die Zytokine IFN- γ und IL-13 einen inhibitorischen Einfluss auf die GR-Transaktivierung ausübten, zeigten IL-8, IL-1 β sowie IL-6 eine Tendenz zur Steigerung der Dexamethason-induzierten Transaktivierung durch den GR. Der für TNF- α im ersten Teil dieser Arbeit beschriebene synergistische Effekt mit GC war somit bei weitem nicht für alle bei CED relevanten Zytokine beobachtbar.

Um zu analysieren, ob ein positiver Effekt auf das Ausmaß der GR-Transaktivierung in HT-29/B6-GR-Zellen stets auch eine verstärkte Induktion des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports nach sich zieht, wurde im Folgenden für IL-6 und IL-1 β der Einfluss auf den Amilorid-sensitiven Kurzschlussstrom in Gegenwart von Dexamethason charakterisiert (Abb. 3. 19).

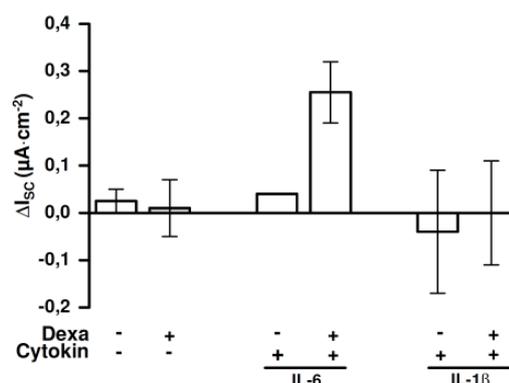


Abb. 3. 19: Einfluss von IL-6 und IL-1 β auf den ENaC-vermittelten Na⁺-Transport. Konfluente, auf Filtern gewachsene Monolayer von HT-29/B6-GR-Zellen wurden für 24 h mit Dexamethason (1 μ M) und/oder IL-6 (100 U/ml) bzw. IL-1 β (20 ng/ml)

inkubiert. Die ENaC-vermittelte Na^+ -Resorption wurde aus dem Abfall des I_{SC} innerhalb von 10 min nach apikaler Zugabe von Amilorid (10^{-4} M) ermittelt. Gezeigt ist $\text{MW} \pm \text{SEM}$ (n=2).

Bei der Analyse des ΔI_{SC} zeigte sich, dass im Falle des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 eine dem TNF- α -Effekt ähnliche synergistische Wirkung im Zusammenspiel mit Dexamethason auftrat. Dies war im Gegensatz dazu bei IL-1 β nicht der Fall, so dass der generelle Rückschluss von einer Verstärkung der Dexamethason-induzierten GR-Transaktivierung auf eine Steigerung des ENaC-vermittelten Na^+ -Transports nicht gegeben ist.

3. 2 Charakterisierung eines Aldosteron-sensitiven epithelialen Modells humaner Colonzellen

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte die rasche und ausgeprägte resorptionssteigernde Wirkung von Glucocorticoiden bei der Therapie von CED durch ein synergistisches Zusammenspiel mit TNF- α begründet werden. Im Hinblick auf die Mineralocorticoid (MC)-abhängige Induktion des ENaC-vermittelten Na^+ -Transports blieben bislang jedoch zahlreiche Fragen ungeklärt. So ist bisher die beschriebene antagonistische Wirkung von TNF- α und anderen bei CED relevanten Zytokinen auf die MC-vermittelte ENaC-Induktion wenig charakterisiert (Amasheh *et al.*, 2004; Barmeyer *et al.*, 2004a, Zeissig *et al.*, 2008). Bezüglich der durch Butyrat hervorgerufenen Steigerung der ENaC-Expression im Colon blieb offen, über welchen essentiellen Mechanismus die Präsenz von Corticosteroiden zu einer apikalen Lokalisation des ENaC führt (Zeissig *et al.*, 2007).

Der Mangel eines geeigneten Zellmodells, das die Expression eines funktionell aktiven MR und somit die Vermittlung eines ENaC-abhängigen Na^+ -Transports durch Stimulation mit nano-molaren Dosen von Aldosteron gewährleistet, erschwerte bislang die experimentelle Herangehensweise. Aus diesem Grund ist im Folgenden zweiten Teil dieser Arbeit die Generierung einer Colonzelllinie beschrieben, die eine induzierbare Expression des MR sowie ENaC-vermittelten Na^+ -Transport aufweist.

3. 2. 1 Generierung einer MR-exprimierenden epithelialen Colonzelllinie

Für die Generierung einer MR-exprimierenden Colonzelllinie wurde das induzierbare *Tet-On*[®] *Inducible Gene Expression*-System gewählt. Es wurden die oben beschriebenen HT-29/B6-Zellen verwendet, welche stabil mit dem Plasmid pTet-On transfiziert wurden, das für rtTA (*reverse tet-responsive transcriptional activator*) kodiert. Bei Anwesenheit von Tetracyclin (hier: Doxycylin) induziert rtTA die Transkription eines unter der Kontrolle eines TRE (*tet-responsive element*) stehenden Gens, das mittels einer zweiten stabilen Transfektion in die

Zellen eingebracht werden kann. Zu diesem Zweck wurde die cDNA des humanen Mineralocorticoidrezeptors in das Plasmid pTRE2hyg kloniert und stabil in HT-29/B6-Tet-On-Zellen transfiziert. Der gewonnene Zellklon wird im Folgenden als HT-29/B6-Tet-On-MR bezeichnet werden.

Die Expression des humanen MR in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen wurde nach Stimulation der TRE-abhängigen Transkription durch Doxycyclin per Western Blot-Analyse auf Proteinebene nachgewiesen (Abb. 3. 20).

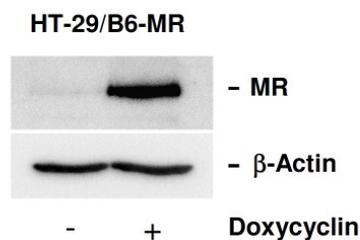


Abb. 3. 20: Analyse der MR-Expression in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen. Western Blot-Analyse des MR (~107 kDa) in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zelllysaten. Die Zellen wurden für 4 Tage in An-oder Abwesenheit von Doxycyclin (1 µg/ml) inkubiert und Zelllysate präpariert. Humanes β-Actin (~42 kDa) diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist eins von drei unabhängigen Experimenten, die vergleichbare Resultate lieferten.

Die Funktionalität des exprimierten MR wurde anhand eines Genreporter-Assays charakterisiert, bei dem die MR-vermittelte Transaktivierung in Abhängigkeit von *Hormone Response Elements* (HRE) charakterisiert wurde. Dazu wurde das Plasmid pMMTV-Luc (Maus-Mammatumovirus) eingesetzt, bei dem sich ein *Firefly*-Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines HRE-enthaltenden Promotors befindet. Nach transienter Transfektion mit pMMTV-Luc wurden HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen für 24 h mit Aldosteron in einer Konzentration von 3 nM stimuliert und anschließend die Luciferase-Aktivität gemessen (Abb. 3. 21 A).

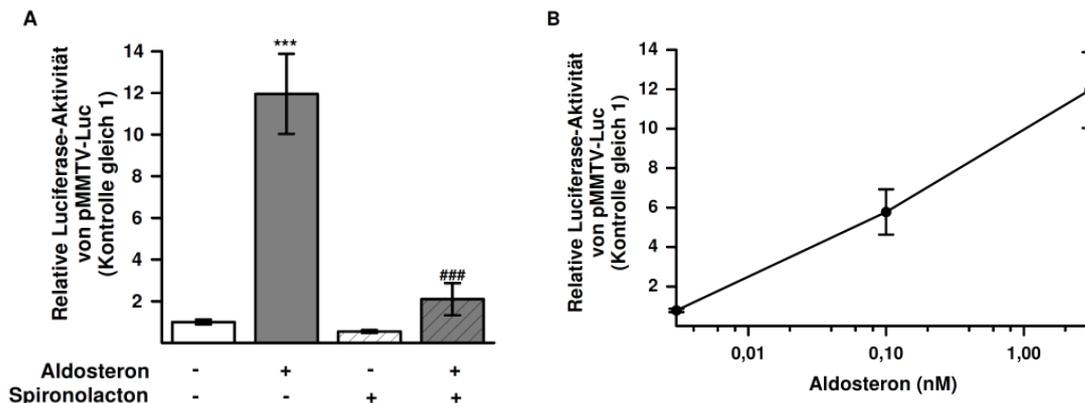


Abb. 3. 21: Analyse der Funktionalität des MR in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen. (A) Reporteragen-Assay zur Analyse der MR-vermittelten Transaktivierung. HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen wurden transient mit pMMTV-Luc transfiziert und für 24 h mit Aldosteron (3 nM) inkubiert. Spironolacton (1 μ M) wurde 1 h vor Aldosteron verabreicht. Die Ergebnisse stellen die normalisierte relative Luciferase-Aktivität dar. Gezeigt sind MW \pm SEM, n=6-9, ***p<0,001 verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, ###p<0,001 verglichen mit Aldosteron-Behandlung. (B) Dosis-Wirkungskurve für die MR-Transaktivierung in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen. Die Zellen wurden transient mit pMMTV-Luc transfiziert und für 24 h mit Aldosteron in einem Konzentrationsbereich von 3 pM bis 3 nM inkubiert. Gezeigt sind MW \pm SEM, n=8.

Es zeigte sich eine Aldosteron-induzierte, relative Luciferase-Aktivität von $11,95 \pm 1,93$ -fach gegenüber Kontrollbedingungen. Nach Vorinkubation mit dem selektiven MR-Antagonisten Spironolacton (1 μ M) reduzierte sich diese Aktivität auf $2,09 \pm 0,77$ -fach. Diese Beobachtung bestätigte die MR-Spezifität des Effekts. Weiterhin konnte für die MR-vermittelte Transaktivierung eine klare Dosis-Wirkungsabhängigkeit ermittelt werden, die in einem Bereich von 3 pM bis 3 nM analysiert wurde (Abb. 3. 21 B).

3. 2. 2 Aldosteron-vermittelte ENaC-Induktion in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen

Die fehlende Fähigkeit der HT-29/B6-Zellen, in Abhängigkeit von Gluco- oder Mineralocorticoiden einen ENaC-vermittelten Na^+ -Transport zu entwickeln, wurde auf ihre Defizienz von sowohl GR- als auch MR-Expression zurückgeführt (Mick *et al.*, 2001). Um herauszufinden, ob ähnlich der stabilen Transfektion mit dem GR auch die induzierbare MR-Expression in diesen Zellen die Corticosteroid-abhängige ENaC-Expression wiederherstellen kann, wurde im Folgenden die HT-29/B6-Tet-On-MR-Linie mit Aldosteron inkubiert und der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom analysiert (Zeissig *et al.*, 2006). Wie in Abb. 3. 22 dargestellt, rief die Inkubation mit Aldosteron (3 nM) bei einer Inkubationsdauer von 48 h jedoch keinen signifikanten ENaC-vermittelten Na^+ -Transport hervor ($-0,04 \pm 0,05 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

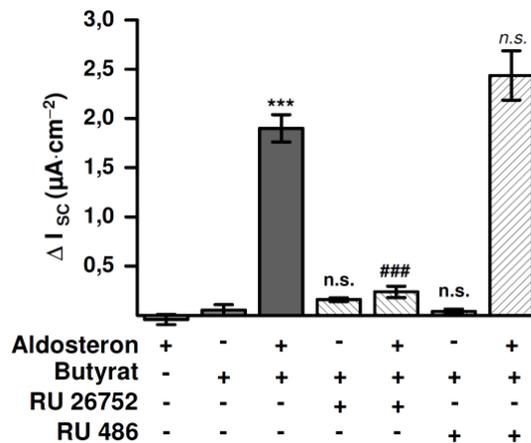


Abb. 3. 22: Charakterisierung des elektrogenen Na⁺-Transports in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen. Konfluente, auf Filtern gewachsene Monolayer von HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen wurden für 48 h mit Aldosteron (3 nM) und/oder Butyrat (2 mM) inkubiert. Mit den Antagonisten RU-26752 (1 μM) und RU-486 (10 μM) wurde für 1 h vorinkubiert. Die ENaC-vermittelte Na⁺-Resorption wurde aus dem Abfall des I_{sc} innerhalb von 10 min nach apikaler Zugabe von Amilorid (10⁻⁴ M) ermittelt. Gezeigt ist MW ± SEM, n=5-8, ***p<0,001 und n.s. verglichen mit Butyrat-Inkubation; ###p<0,001 und n.s. verglichen mit Butyrat plus Aldosteron.

Da für die kurzkettige Fettsäure Butyrat gezeigt wurde, dass sie die Transkription von β- und γ-ENaC in Colonocyten steigern kann (Zeissig *et al.*, 2007), wurden HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen zusätzlich zu Aldosteron in Gegenwart von Butyrat (2 mM) inkubiert. Hierbei wurde die Konzentration von Butyrat, die unter Normalbedingungen im Colon vorliegt (10 – 25 mM), nicht überschritten. Abb. 3. 21 zeigt, dass unter dem kostimulatorischen Einfluss von Butyrat und Aldosteron ein ausgeprägter Amilorid-sensitiver Kurzschlussstrom (1,87 ± 0,15 μA/cm²) nachweisbar war, während die Inkubation mit Butyrat allein keinen solchen Effekt hervorrief (0,06 ± 0,07 μA/cm²). Ohne die Präsenz von Doxycyclin kam es auch in Gegenwart von Butyrat und Aldosteron zu keinem signifikanten ΔI_{sc} (0,11 ± 0,03 μA/cm²), so dass eine Abhängigkeit des beobachteten Effekts von der Expression eines funktionell aktiven MR gegeben war. Dies wurde zusätzlich durch den Einsatz des selektiven MR-Antagonisten RU-26752 und des GR-Antagonisten RU-486 bestätigt (Abb. 3. 22).

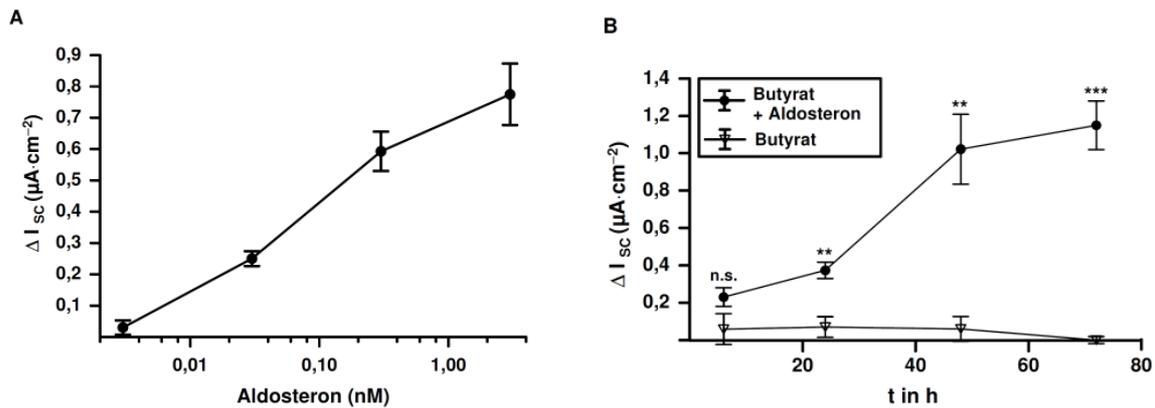


Abb. 3. 23: Dosis- und Zeitabhängigkeit des Aldosteron-induzierten elektrogenen Na⁺-Transports in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen. (A) Die Zellen wurden für 48 h mit Aldosteron (3 pM bis 3 nM) in Gegenwart von Butyrat (2 mM) inkubiert und anschließend wurde ΔI_{sc} wie in Abb. 3. 21 beschrieben ermittelt. Gezeigt sind MW \pm SEM, n=4. (B) Die Zellen wurden mit Butyrat (2 mM) allein oder in Kombination mit Aldosteron (3 nM) für verschiedene Inkubationszeiten stimuliert. Gezeigt sind MW \pm SEM, n=5, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 und n.s. verglichen mit Butyrat-Behandlung allein.

Die Induktion des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports durch Aldosteron in Gegenwart von Butyrat wies für Aldosteron in einem Konzentrationsbereich von 3 pM bis 3 nM eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung auf (Abb. 3.23 A). Bei der Analyse der Zeitabhängigkeit der Induktion des Na⁺-Transports zeigte sich nach 6 h noch kein Anstieg (Abb. 3.23 B). Nach 24 kam es zu einer signifikanten Änderung der ENaC-Aktivität in Abhängigkeit von Aldosteron in Gegenwart von Butyrat, die nach 72 h ihr Maximum erreichte ($1,15 \pm 0,13 \mu A/cm^2$ verglichen mit Butyrat-Inkubation allein $0,00 \pm 0,02 \mu A/cm^2$).

Im Folgenden wurde untersucht, ob der Steigerung der Rate des elektrogenen Na⁺-Transports eine verstärkte Transkription von ENaC-Untereinheiten zugrunde lag. In Übereinstimmung mit früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Expression von β - als auch γ -ENaC auf mRNA-Ebene unter dem Einfluss von Butyrat erhöht wurde (Zeissig *et al.*, 2007). Auch die Inkubation mit Aldosteron allein bewirkte einen Anstieg im mRNA-Niveau von β - und γ -ENaC. Allerdings zeigte sich eine ausgeprägte Verstärkung dieses Effekts bei der gleichzeitigen Stimulation mit beiden Induktoren, wobei das resultierende mRNA-Niveau größer als additiv ausfiel (Abb. 3. 24).

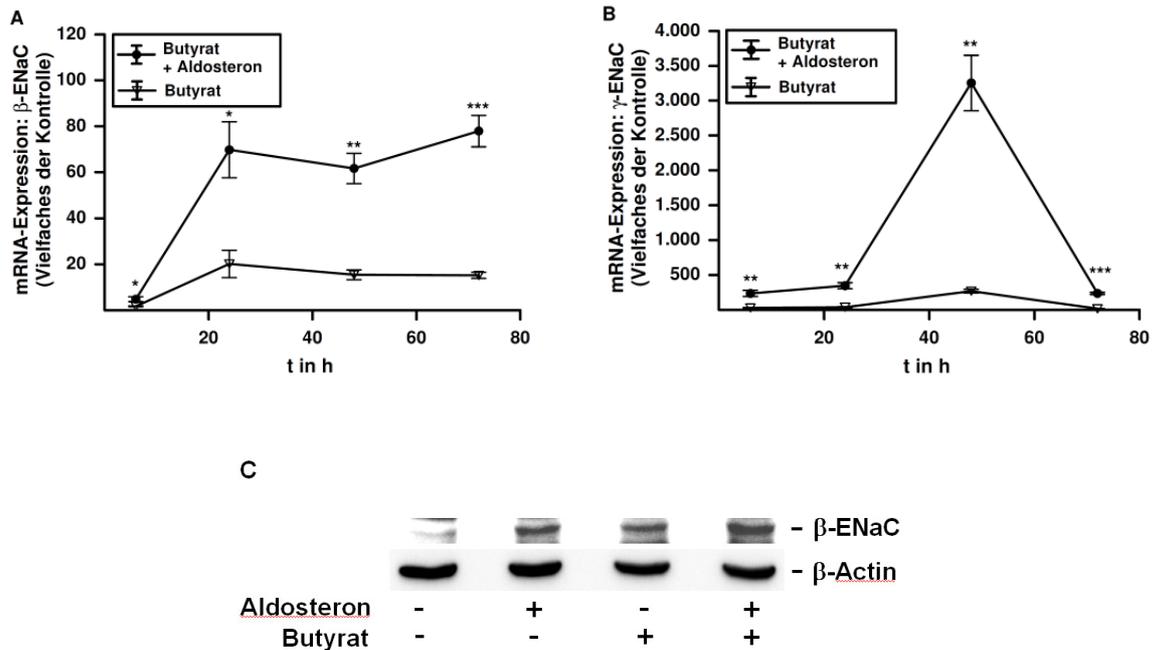


Abb. 3. 24: Analyse der mRNA- und Proteinexpression der ENaC-Untereinheiten unter dem Einfluss von Butyrat und Aldosteron. (A, B) HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen wurden mit Butyrat (2 mM) und/oder Aldosteron (3 nM) inkubiert. Per Real-time RT-PCR wurde das mRNA-Expressionsniveau der ENaC-Untereinheiten β und γ analysiert. GAP-DH diente zur Normalisierung der mRNA-Expression. Gezeigt sind MW \pm SEM des Vielfaches der Induktion gegenüber der Kontrolle (n=5, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 verglichen mit Butyrat). (C) HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen wurden mit Butyrat (2 mM) und/oder Aldosteron (3 nM) für 48 h inkubiert. Gesamtzelllysate wurden präpariert und per Western Blot die Expression des β -ENaC (~60 kDa) charakterisiert. Pro Spur wurden 100 μ g Protein aufgetragen, humanes β -Actin (~42 kDa) diente als Ladekontrolle.

So wurde beispielsweise für die γ -ENaC-Untereinheit nach 48 h eine Aldosteron-vermittelte Expressionssteigerung von 248 ± 31 -fach gegenüber der Kontrolle beobachtet, bei Butyrat-Behandlung lag dieser Wert bei 268 ± 30 -fach. Nach der kombinierten Stimulation mit Butyrat und Aldosteron wurde die γ -ENaC-mRNA jedoch auf ein Niveau von 3253 ± 399 -fach gegenüber der Kontrolle gesteigert. Das mRNA-Niveau des ENaC-Untereinheit α wurde ebenfalls analysiert und blieb bei allen experimentellen Bedingungen konstant (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit den für die mRNA ermittelten Daten zeigte auch die Western Blot-Analyse, die exemplarisch für den β -ENaC-Untereinheit durchgeführt wurde, eine verstärkte Proteinexpression nach Inkubation mit Aldosteron und Butyrat (Abb. 3. 24C). Auch hier mangelte es für den Nachweis des γ -ENaC mittels Immunodetektion an einem funktionsfähigen Antikörper. Aus diesem Grund beschränkte sich der Proteinnachweis per Western Blot auf die ENaC-Untereinheit β .

Dass die Steigerung der mRNA-Expression von β - und γ -ENaC ein MR-vermittelter Effekt war, zeigte die Inhibition dieses Effekts durch eine Vorinkubation mit dem MR-Antagonisten RU-26752 (1 μ M). Der Einsatz dieses Inhibitors in Gegenwart von Butyrat und Aldosteron für

48 h senkte die Induktion der γ -ENaC-mRNA auf einen Wert von 347 ± 19 -fach ($n=6$ $p<0,001$ verglichen mit Butyrat/Aldosteron-Inkubation).

3. 2. 3 Einfluss von Butyrat auf Protein- und mRNA-Expressionsniveau des Mineralocorticoidrezeptors

Aus den zuvor beschriebenen Resultaten für die Expressionssteigerung von β - und γ -ENaC unter dem Einfluss von Butyrat und Aldosteron ging hervor, dass weder die durch Aldosteron allein noch die von Butyrat hervorgerufene Expressionssteigerung des ENaC für einen detektierbaren Amilorid-sensitiven Kurzschlussstrom in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen ausreichte. Daher sollte die Frage nach dem Mechanismus, der der verstärkten ENaC-Aktivität durch die kombinierte Inkubation mit Aldosteron und Butyrat zugrunde lag, aufgeklärt werden.

Es wurde beschrieben, dass Butyrat in der Colonzelllinie T84 ursächlich für eine gesteigerte MR-Expression ist (Fukushima *et al.*, 1999). Bei der Charakterisierung der Wirkung von Butyrat bezüglich des MR-Expressionsniveaus in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen wurde ersichtlich, dass im HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellsystem ebenfalls eine verstärkende Wirkung auftrat (Abb. 3. 25).

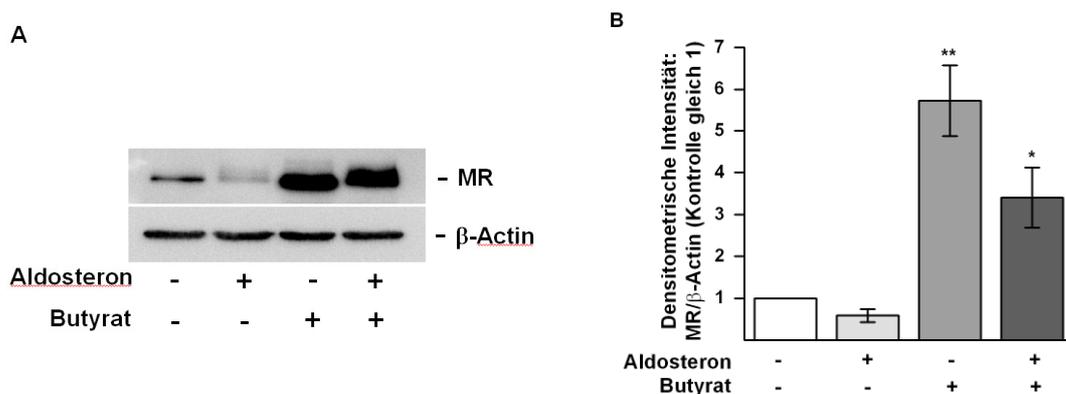


Abb. 3. 25: Charakterisierung der Proteinexpression des MR unter dem Einfluss von Butyrat und Aldosteron. (A) HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen wurden für 24 h mit Butyrat (2 mM) und/oder Aldosteron (3 nM) stimuliert. Nach der Präparation von Gesamtzelllysaten wurde die Expression des MR (~107 kDa) per Western Blot-Analyse charakterisiert. Als Ladekontrolle diente β -Actin (~42 kDa). Dargestellt ist ein repräsentatives von vier unabhängigen Experimenten. (B) Densitometrische Analyse der MR-Proteinexpression der wie in (A) beschrieben behandelten Zellen, normalisiert auf β -Actin. Gezeigt sind $MW \pm SEM$, $n=4$, $*p<0,05$, $**p<0,01$ verglichen mit Aldosteron.

Unter dem Einfluss von Butyrat (2 mM) über 24 h verstärkte sich das Proteinniveau des MR auf $5,7 \pm 0,9$ -fach gegenüber Kontrollbedingungen. In Kombination mit Aldosteron lag diese Verstärkung bei einem Wert von $3,4 \pm 0,7$ -fach. Ein ähnliches Resultat lieferte die Analyse der MR-Expression auf der Basis der Immunfluoreszenzfärbung. Es zeigte sich über die

Auswertung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM), dass in Gegenwart von Aldosteron eine nukleäre Lokalisation des MR nachweisbar ist. Nach Inkubation mit Butyrat steigerte sich das cytosolische Signal des MR im Vergleich zur Kontrollbedingung. Bei Kostimulation durch Butyrat und Aldosteron zeigte sich ein nukleäres Signal, das im Vergleich zur alleinigen Aldosteron-Inkubation stärker ausgeprägt war (Abb. 3. 26).

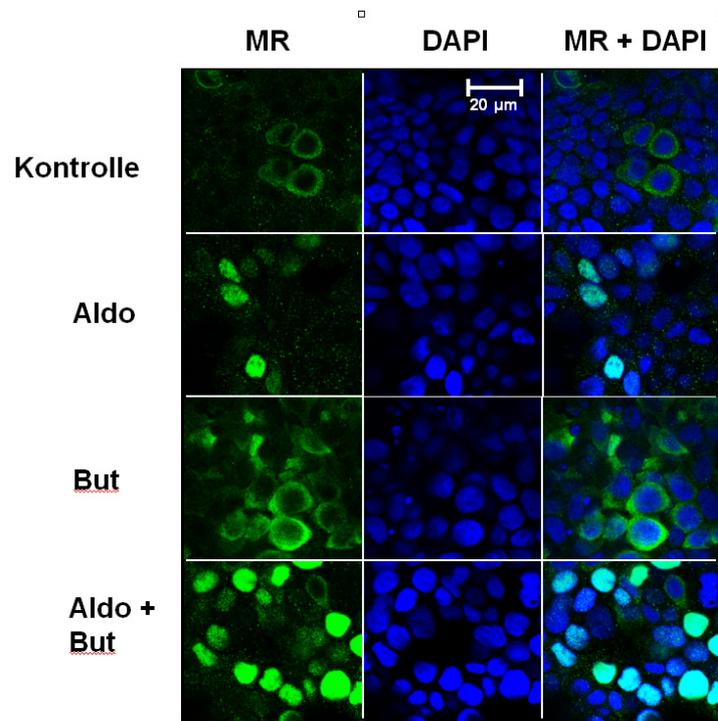


Abb. 3. 26: Einfluss von Butyrat und Aldosteron auf die subzelluläre Lokalisation des MR in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen. HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen wurden für 24 h mit Aldosteron (3 nM) und/oder Butyrat (2 mM) inkubiert und anschließend einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Dabei wurde mit anti-MR-Antikörper (grün) gefärbt und eine Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Die mikroskopische Analyse erfolgte unter Verwendung eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.

Bei weiterer Analyse konnte nachgewiesen werden, dass auch auf mRNA-Ebene eine Verstärkung der MR-Expression durch Butyrat induziert wird (Abb. 3. 27). Nach Butyrat-Inkubation (2 mM) für 24 h stieg das mRNA-Niveau des MR auf $8,7 \pm 0,7$ -fach im Vergleich zur Kontrolle an. Auch bei gleichzeitiger Präsenz von Aldosteron stieg die mRNA-Expression nicht weiter an und lag bei $6,4 \pm 0,7$ -fach (n.s. versus Butyrat allein).

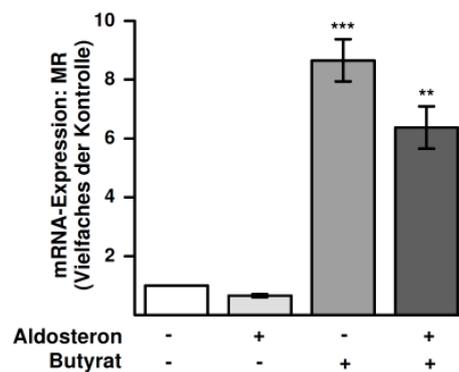


Abb. 3. 27: mRNA-Expression des MR in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen: Einfluss von Butyrat und Aldosteron. Die Zellen wurden für 24 h mit Butyrat (2 mM) und/oder Aldosteron (3 nM) stimuliert. Nach RNA-Isolation wurde das Expressionsniveau der MR-mRNA mit Real-time RT-PCR untersucht. Die Expression des *Housekeeping*-Gens GAP-DH wurde zur Normalisierung herangezogen. Gezeigt sind MW \pm SEM des Vielfachen der Induktion der mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle (n=5, ***p<0,001 und **p<0,01 verglichen mit Aldosteron-Behandlung).

Aufgrund der Beobachtung eines erhöhten MR-Niveaus bedingt durch die Präsenz von Butyrat ließ sich vermuten, dass die vermehrt für die Bindung des Liganden Aldosteron und damit zur Aktivierung bereitstehenden MR-Moleküle ursächlich für die verstärkte Transkription der ENaC-Untereinheiten β und γ sind.

3. 2. 4 Regulation der MR-abhängigen Transaktivierung durch Butyrat und Aldosteron

Wie bereits beschrieben wird davon ausgegangen, dass die transkriptionelle Induktion des ENaC im Colon durch die Corticosteroidrezeptor-vermittelte Transaktivierung über weit vom proximalen Promotorbereich des β - und γ -ENaC entfernt gelegene HRE-Sequenzen ermöglicht wird (Thomas *et al.*, 2002). Bei der Analyse von Protein- und mRNA-Gehalt des MR wurde eine Butyrat-induzierte Steigerung festgestellt, die unabhängig von der gleichzeitigen Anwesenheit von Aldosteron war. Um die oben genannte Annahme zu untermauern, dass die unter Butyrat vermehrt zur Aktivierung bereitstehenden MR-Moleküle ursächlich für die verstärkte Transkription der ENaC-Untereinheiten β und γ sind, wurde die MR-vermittelte Transaktivierung in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen unter dem Einfluss von Butyrat und Aldosteron untersucht. Dazu wurde mittels Reporter-gen-Assay die HRE-kontrollierte Transaktivierung analysiert (Abb. 3. 28).

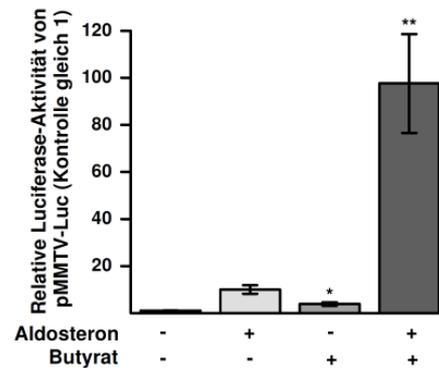


Abb. 3. 28: Genreporter-Assay in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen: MR-vermittelte Transaktivierung. HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen wurden transient mit pMMTV-Luc transfiziert und für 24 h mit Aldosteron (3 nM) und/oder Butyrat (2 mM) inkubiert. Die Ergebnisse stellen die normalisierte relative Luciferase-Aktivität dar. Gezeigt sind MW ± SEM, n=7, *p<0,05 und **p<0,01 verglichen mit Aldosteron-Behandlung.

Das Ergebnis des Genreporter-Assays wies entsprechend der Arbeitshypothese tatsächlich eine erhöhte MR-Transaktivierung nach der simultanen Inkubation mit Butyrat und Aldosteron nach (97,6 ± 21,2-fach), die verglichen mit der alleinigen Aldosteron-Stimulation stark gesteigert war (10,0 ± 1,8-fach). Die Inkubation mit Butyrat allein rief hingegen keine verstärkte MR-abhängige Transaktivierung hervor. Weiterhin wurde die Aktivität der Promotoren von β - und γ -ENaC unter dem Einfluss von Butyrat und Aldosteron untersucht. Es ist bekannt, dass Butyrat die Promotoraktivität beider Gene im Colon steigert, im Falle des γ -ENaC wurde eine Vermittlung dieses Effekts durch den Transkriptionsfaktor Sp3 nachgewiesen (Zeissig et al., 2007).

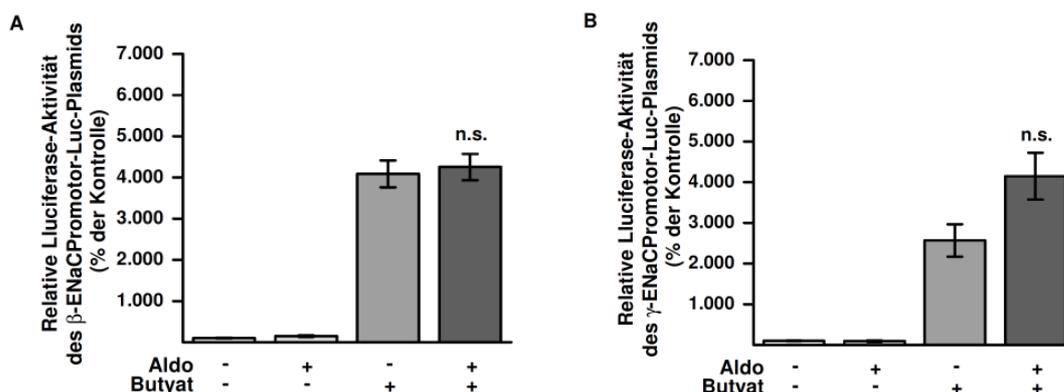


Abb. 3. 29: Genreporter-Assay in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen: Promotoraktivität von β - und γ -ENaC. HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen wurden transient mit (A) pbhENaC-A (β -ENaC-Promotor-Luciferase; -1137 to +200) oder (B) pghENaC-A (γ -ENaC-Promotor-Luciferase; -2926 to +35) transfiziert und für 24 h mit Aldosteron (3 nM) und/oder Butyrat (2 mM) inkubiert. Die Ergebnisse stellen die normalisierte relative Luciferase-Aktivität dar. Gezeigt sind die MW ± SEM (n=3, n.s. verglichen mit Aldosteron-Behandlung).

Wie in Abb. 3. 29 ersichtlich ist, zeigte sich auch in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen ein vergleichbarer Effekt durch Butyrat. Allerdings vergrößerte die zusätzliche Gabe von Aldosteron die Promotoraktivität beider Gene nicht. So ist auch in diesem System davon auszugehen, dass durch das gesteigerte Proteinniveau des MR die Transaktivierung von β - und γ -ENaC abhängig von außerhalb der proximalen Promotorregionen gelegenen HRE-Sequenzen verstärkt wird.

3. 2. 5 ENaC-Expressionsniveau und ENaC-Aktivität in der apikalen Membran unter Aldosteron und Butyrat

Wie in Abschnitt 3. 2. 2 beschrieben wurde nach der Kostimulation mit Butyrat und Aldosteron eine Steigerung der ENaC-Expression beobachtet, die über ein additives Niveau verglichen mit der jeweiligen Inkubation mit beiden Substanzen allein hinausging. Ungeklärt blieb bisher allerdings die Frage, ob dieser Anstieg an sich dafür verantwortlich ist, einen signifikanten Amilorid-sensitiven Kurzschlussstrom hervorzurufen, und das Expressionsniveau der ENaC-Untereinheiten nach alleiniger Inkubation mit Butyrat oder Aldosteron dafür jeweils zu gering war. Es muss ebenso die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass aufgrund des Einflusses von Butyrat eine MR-vermittelte Steigerung der ENaC-Expression erreicht wurde und zusätzlich ein weiteres Aldosteron-abhängiges Signal existiert, das eine messbare ENaC-Aktivität in der apikalen Membran ermöglichte. Zur näheren Charakterisierung wurden daher HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen mit steigenden Konzentrationen von Butyrat inkubiert. Diese führten zu einer ENaC-Expression, welche mit dem ENaC-Niveau vergleichbar war, das nach Kostimulation mit Aldosteron und Butyrat gemessen worden war. Korrespondierend dazu wurde in gleichartig behandelten Zellen der Amilorid-sensitive Kurzschlussstrom gemessen (Abb. 3. 30).

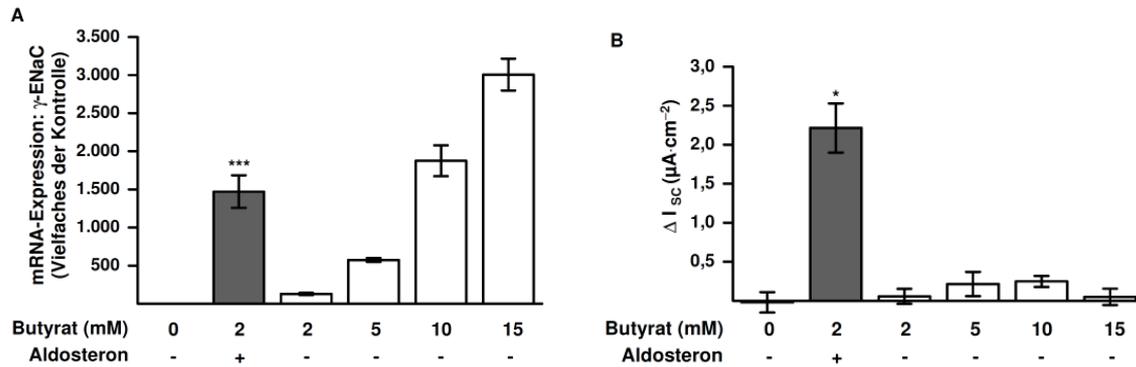


Abb. 3. 30: Dosis-Wirkungsbeziehungen für die mRNA-Expression des γ -ENaC und ΔI_{sc} unter Butyrat. HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen wurden für 48 h mit Butyrat in einem Konzentrationsbereich von 2 mM bis 15 mM inkubiert. (A) Bestimmung des mRNA-Expressionsniveaus des γ -ENaC per Real-time RT-PCR. GAP-DH diente zur Normalisierung der mRNA-Expression. Gezeigt sind MW \pm SEM des Vielfachen der Induktion der mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle (n=6, ***p<0,001 verglichen mit Butyrat (2 mM)). (B) Analyse der Dosisabhängigkeit des ΔI_{sc} . Gezeigt sind MW \pm SEM, n=6, *p<0,05.

Nach der 48-stündigen Inkubation mit Butyrat in einer Konzentration von 10 bzw. 15 mM verstärkte sich die mRNA-Expression des γ -ENaC auf ein Niveau von 1874 ± 203 bzw. 3004 ± 210 -fach gegenüber der Kontrolle (Abb. 3. 30 A). Diese ENaC-Expression liegt im Bereich der durch Aldosteron und Butyrat hervorgerufenen Steigerung (Abb. 3. 24 B). Dennoch wurde bei der Messung des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms offenbar, dass Butyrat allein in keiner der eingesetzten Konzentrationen einen signifikanten ENaC-vermittelten Na^+ -Transport induzieren konnte (Abb. 3. 30 B).

Dieses Ergebnis legte nahe, dass Aldosteron essentiell für die Aktivität und Lokalisation des ENaC in der apikalen Membran ist. In diesem Zusammenhang wurden mehrere corticosteroidinduzierte Gene interessant, welche bei der Verminderung der ENaC-Ubiquitinierung und der daraus folgenden Anreicherung des ENaC in der apikalen Membran eine Rolle spielen. Dabei handelte es sich einerseits um *Glucocorticoid-induced leucine zipper* (GILZ), das die ERK1/2-vermittelte ENaC-Internalisierung/Degradation inhibiert (Soundararajan *et al.*, 2007). Relevant erschien andererseits die *Serum- and glucocorticoid-induced kinase-1* (SGK-1), die durch Phosphorylierung die ENaC-Ubiquitinligase Nedd4-2 hemmt, und das kleine G-Protein K-Ras-2A, von dem eine SGK-1-aktivierende Wirkung angenommen wird (Brennan & Fuller, 2006; Debonneville *et al.*, 2001). Die mRNA-Expression dieser Gene wurde daher in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen nach Inkubation mit Butyrat und/oder Aldosteron für verschiedene Inkubationsperioden per Real-time RT-PCR charakterisiert (Abb. 3. 31).

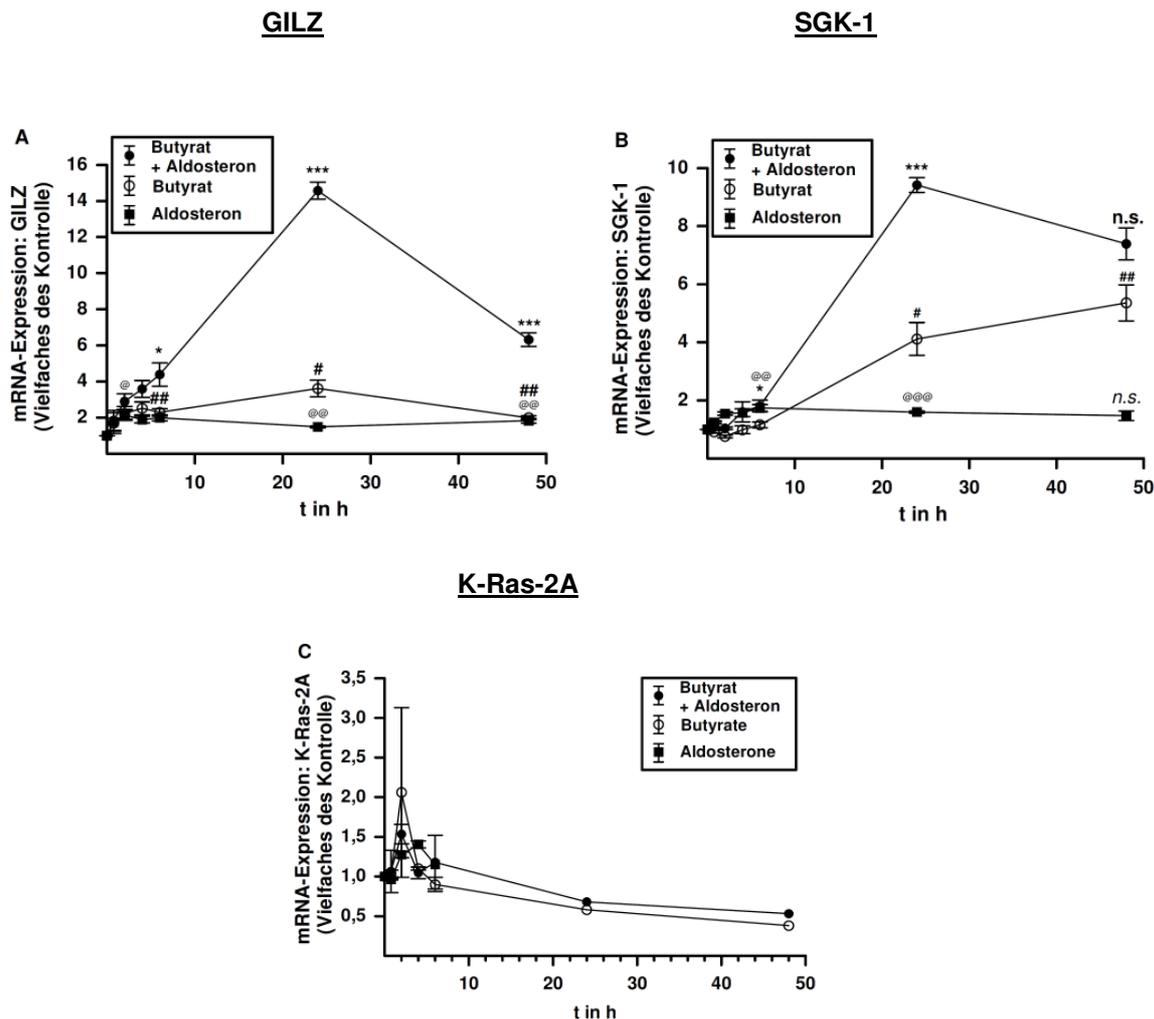


Abb. 3. 31: Zeitverlauf der mRNA-Expression von GILZ, SGK-1 und K-Ras-2A in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen. Die Zellen wurden für 0 min, 45 min, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h in Gegenwart von Butyrat (2 mM) und/oder Aldosteron (3 nM) inkubiert. Per Real-time RT-PCR wurde das Expressionsniveau der mRNA von humanem GILZ, SGK-1 und K-Ras-2A bestimmt. GAP-DH diente zur Normalisierung der mRNA-Expression. Gezeigt sind MW \pm SEM des Vielfachen der Induktion der mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle (n=4, *p<0,05 und ***p<0,001 und n.s. Butyrat/Aldosteron verglichen mit Butyrat; #p<0,05 und ##p<0,01 und n.s. Butyrat verglichen mit der Kontrolle; @p<0,05, @@p<0,01 und @@@p<0,001 Aldosteron verglichen mit der Kontrolle).

In Abb. 3. 31 A ist die mRNA-Expression von humanem GILZ als Vielfaches der Expression in unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. Es zeigte sich, dass unter dem Einfluss von Aldosteron bei gleichzeitiger Stimulation mit Butyrat ein ausgeprägter Anstieg der GILZ-mRNA erfolgte. Dieser erreichte nach 24 h ein Maximum ($14,58 \pm 0,47$ -fach). Bei Inkubation mit Aldosteron allein zeigte sich keine vergleichbar große Induktion, hier wurde ein Maximum bereits nach 2 h erreicht ($2,16 \pm 0,24$ -fach, @p<0,05 verglichen mit der Kontrolle). Nach Stimulation mit Butyrat ergab sich ein ähnliches Bild, hier erreichte die Induktion nach 24 h einen maximalen Wert von $3,61 \pm 0,46$ -fach (#p<0,05 verglichen mit der Kontrolle).

Bei der Charakterisierung der mRNA-Expression von SGK-1 (Abb. 3. 31 B) fiel zunächst ebenfalls ein starker Anstieg unter der Wirkung von Butyrat und Aldosteron auf, der nach 24 h sein Maximum erreichte ($9,42 \pm 0,25$ -fach). Auch hier konnte durch die Inkubation mit Aldosteron allein nur ein moderater Anstieg beobachtet werden (maximal $1,74 \pm 0,12$ -fach nach 6 h). Für SGK-1 zeigte sich im Fall der Inkubation mit Butyrat eine nach 24 h einsetzende Steigerung des mRNA-Niveaus, die nach 48 h einen Wert von $5,46 \pm 0,62$ -fach erreichte.

Bezüglich der Expression des kleinen G-Proteins K-Ras-2A (Abb. 3. 31C) ließ sich unter keiner der gewählten experimentellen Bedingungen eine signifikante Steigerung des mRNA-Niveaus nachweisen. Nach längeren Inkubationsperioden (ab 24 h) kam es hier tendenziell sogar zu einer Verminderung der gemessenen K-Ras-2A-mRNA. Die zur mRNA-Expression von GILZ, SGK-1 und K-Ras-2A gewonnenen Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass eine Rolle des Leucin-Zipper-Proteins GILZ aufgrund der ausgeprägten Expressionssteigerung, die nur nach Kostimulation mit Butyrat und Aldosteron beobachtet werden konnte, für die vermehrte apikale Lokalisation des ENaC unter Butyrat und Aldosteron wahrscheinlich ist. Um zu überprüfen, ob auch in vivo eine GILZ-Regulation durch Aldosteron und Butyrat erfolgt, wurde spät-distales Rattencolon aus Albino-Wistar-Ratten (Wildtyp) in die Ussing-Kammer eingespannt und für 1,5 bzw. 4 h inkubiert. Nach RNA-Isolation aus den exponierten Gewebeabschnitten wurde das mRNA-Niveau von GILZ (Ratte) per Real-time RT-PCR bestimmt (Abb. 3. 32).

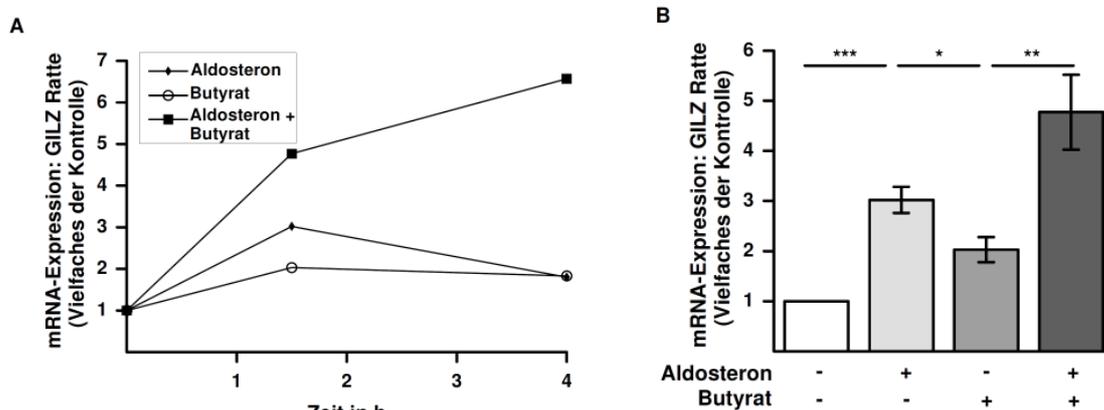


Abb. 3. 32: mRNA-Expression von GILZ im distalen Colon der Ratte. (A) Zeitverlauf der GILZ mRNA-Expression. Distales Rattencolon wurde in die Ussing-Kammer eingespannt und mit Aldosteron (3 nM) und/oder Butyrat (2 mM) für 1,5 h bzw. 4 h inkubiert. Per Real-time RT-PCR wurde das Expressionsniveau der mRNA vom GILZ der Ratte bestimmt. GAP-DH diente zur Normalisierung der mRNA-Expression. Gezeigt sind MW \pm SEM des Vielfachen der Induktion der mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle (n=5-7) (B) GILZ-Expression nach 1,5 h. n=5-7, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Es zeigte sich, dass auch in nativem Rattengewebe eine GILZ-Induktion erfolgte, die mit der in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen vergleichbar war. Während Aldosteron und Butyrat allein jeweils einen rascheren und moderateren Effekt hervorriefen, zeigte die Inkubation mit beiden Reagenzien einen ausgeprägten Effekt, der sich bei längeren Inkubationsperioden zusätzlich verstärkte.

4 DISKUSSION

4.1 Wechselwirkung von Glucocorticoiden und TNF- α bei der Regulation des elektrogenen Na⁺-Transports

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine auf die Glucocorticoid-vermittelte Induktion des epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC) untersucht. Dies erfolgte vor dem Hintergrund schneller und ausgeprägter resorptionssteigernder Effekte von therapeutisch eingesetzten Glucocorticoiden bei der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (Hawker *et al.*, 1980; Sandle *et al.*, 1986). Angesichts der Beobachtung, dass die Präsenz pro-inflammatorischer Zytokine ursächlich für die verminderte ENaC-Induktion durch endogene Mineralocorticoide erscheint, sollte die Fähigkeit von Glucocorticoiden, diesen inhibitorischen Effekt bei der CED-Therapie zu überwinden, analysiert werden (Amasheh *et al.*, 2004; Barmeyer *et al.*, 2004a, Zeissig *et al.*, 2008).

4.1.1 Synergismus von Dexamethason und TNF- α bei der Induktion des ENaC

Die elektrophysiologische Charakterisierung des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports wies eine positive Wirkung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α auf die Glucocorticoid-induzierte ENaC-Aktivität nach. Dieser Effekt konnte angesichts der fehlenden Induktion des ENaC durch das Zytokin allein als Synergismus der durch beide Reagenzien ausgelösten molekularen Abläufe erklärt werden.

Sowohl für das distale Colon der Ratte als auch in dem humanen Colonepithelzellmodell HT-29/B6-GR konnte die synergistische Induktion des Na⁺-Transports via ENaC durch eine verstärkte Expression der ENaC-Untereinheiten β und γ erklärt werden (Bergann *et al.*, 2009b). Im Colon erfolgt die initiale Regulation des ENaC durch die Kontrolle der Transkription der Untereinheiten β und γ (Epple *et al.*, 2000; Renard *et al.*, 1995). Die basale Transkription dieser beiden Untereinheiten ist sehr gering und auf diese Weise der limitierende Faktor für die ENaC-abhängige Na⁺-Resorption, weil ausschließlich ENaC-Kanäle in die Membran inseriert werden und einen maßgeblichen Na⁺-Transport vermitteln, die aus allen drei Untereinheiten zusammengesetzt sind (Canessa *et al.*, 1994; Firsov *et al.*, 1998). Die α -Untereinheit des ENaC weist im Colon dabei eine konstitutive Expression auf, die nicht durch Corticosteroide reguliert ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Induktion der Transkription von β - und γ -ENaC durch Dexamethason und TNF- α über den Einbau vollständiger ENaC-Kanäle in die apikale Membran den gesteigerten ENaC-vermittelten Na⁺-Transport bedingte. Diese Beobachtung stellt einen der seltenen Fälle einer kooperativen Wechselwirkung von TNF- α und Glucocorticoid-vermittelter Signaltransduktion dar, welche sich sonst häufig wechselseitig antagonisieren. Weiter steht der beschriebene

Synergismus im Kontrast zu der nachgewiesenen antagonistischen Wirkung von TNF- α und der Mineralocorticoid-induzierten elektrogenen Na⁺-Resorption, wodurch auf eine verschiedenartige Beeinflussung durch TNF- α im Hinblick auf den Mineralocorticoid- bzw. Glucocorticoid-induzierten ENaC-vermittelten Na⁺-Transport geschlossen werden kann. Diese Thematik wird weiter unten in Abschnitt 4. 1. 3 näher diskutiert werden.

Bei der elektrophysiologischen Charakterisierung der ENaC-vermittelten Na⁺-Resorption zeigten sich Unterschiede im Ausmaß der ENaC-Induktion in distalem Colon der Ratte und dem epithelialen Zellmodell HT-29/B6-GR. Im tierischen Gewebe war nach einer Inkubationsperiode von 14 h unter der alleinigen Wirkung von Dexamethason ein signifikanter Anstieg des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms zu beobachten, der durch die Anwesenheit von TNF- α zusätzlich gesteigert wurde. Hingegen war nach einer Inkubationsperiode von 24 h in HT-29/B6-GR-Zellen nur ein leichter Anstieg des ΔI_{SC} nach Dexamethason-Stimulation nachweisbar, der kein signifikantes Niveau erreichte. Unter dem zusätzlichen Einfluss von TNF- α war dennoch ein starker synergistischer Effekt auf den ΔI_{SC} zu beobachten. Zeissig *et al.* konnten in früheren Arbeiten zeigen, dass die stabile Transfektion von HT-29/B6-Zellen mit dem Glucocorticoidrezeptor (GR) die Generierung eines ENaC-vermittelten Na⁺-Transports induzieren kann (Zeissig *et al.*, 2006). Bei der Charakterisierung des Zeitverlaufs dieser Induktion wurde ein maximaler ΔI_{SC} von $\sim 0,5 \mu A/cm^2$ erst nach einer Inkubationsdauer von 72 h erreicht. Generell fallen damit die an Colonzell-Monolayern im Vergleich zum nativen Gewebe gemessenen Na⁺-Transportraten geringer aus und werden weniger schnell induziert. Im Colon der Ratte werden schon in einem Inkubationszeitraum von 6 bis 8 h maximale Transportraten durch Corticosteroide erreicht (Barmeyer *et al.*, 2004a). Zur Analyse des Zusammenspiels von TNF- α und Dexamethason in HT-29/B6-GR-Zellen wurde die Inkubationsdauer dennoch auf 24 h beschränkt, da eine länger andauernde Exposition dieser Zellen mit TNF- α zu Zellschädigungen führt, die auf einer geschwächten Barriereintegrität sowie einer Apoptoseinduktion beruht (Gitter *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 1999). Aufgrund dessen ist festzustellen, dass der Unterschied zwischen Dexamethason- und Dexamethason/TNF- α -abhängigem Amilorid-sensitiven Kurzschlussstrom in beiden untersuchten Systemen hauptsächlich der Länge der Inkubationsperiode geschuldet ist.

4. 1. 2 Steigerung des GR-Expressionsniveaus durch TNF- α

Bei der näheren Charakterisierung der Mechanismen, die dem Synergismus von Dexamethason und TNF- α zugrundelagen, konnte eine verstärkte GR-abhängige Transaktivierung nachgewiesen werden. Für die transkriptionelle Induktion von β - und γ -ENaC wird von einem gemeinsamen regulatorischen *cis*-Element in einiger Entfernung von den Promotorbereichen der in enger Nachbarschaft gelegenen Gene ausgegangen, das die

Transkription in Abhängigkeit von Gluco- und Mineralocorticoiden vermittelt (Thomas *et al.*, 2002). Es ist daher anzunehmen, dass die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete verstärkte GR-abhängige Transaktivierung ursächlich war für die transkriptionelle Induktion von β - und γ -ENaC und dass diese durch derartige entfernt gelegene GRE-Sequenzen vermittelt wurde. Diese Annahme wurde durch die fehlende Induktion der Aktivität der proximalen Promotorbereiche beider Gene bestätigt. In einer weiträumigen *in silico*-Analyse der den Transkriptionsstartpunkt des γ -ENaC-Gens umgebenden Bereiche wurde die betreffende DNA-Sequenz auf potentielle Bindestellen für den Glucocorticoidrezeptor untersucht. Dies geschah mithilfe des Internet-Webtools TESS (*Transcription Element Search System*), das unter Verwendung der *Transfac Database* eine Vorhersage für Transkriptionsfaktoren-Bindestellen ermöglicht (<http://www.cbil.upenn.edu/tess>) (Schug & Overton, 1997). Bei dieser Suche wurden zwei Halbseiten-Paare von GREs an den Positionen -8750/-8716 bzw. -8103/-8070 gefunden, welche durch 27 Basenpaare voneinander getrennt sind. Innerhalb des Introns 2 des γ -ENaC-Gens fanden sich zwei halbseitige GREs an den Positionen +5048 und +5180. Da einzelne halbseitige GREs ausreichend zur Vermittlung der GR-Transaktivierung sein können und auch Paare von halbseitigen GREs ihre gemeinsame Wirkung entfalten können, wenn sie weiter als 3 Basenpaare voneinander entfernt sind, ist es möglich, dass eine der beschriebenen Sequenzen in diesem Zusammenhang die GR-abhängige Transaktivierung vermittelt (Schoneveld *et al.*, 2004; Schuetz *et al.*, 1996). Um einen direkten Nachweis dafür zu erbringen, müsste in zukünftigen Experimenten eine gezielte Analyse des Einflusses der genannten Sequenzabschnitte auf die GR-abhängige Transaktivierung erfolgen.

Die Ursache für die gesteigerte GR-Transaktivierung bei gleichzeitiger Stimulation mit TNF- α und Dexamethason konnte in dem erhöhten Proteinniveau des Rezeptors gefunden werden. Da das Protein unter dem Einfluss von TNF- α vermehrt vorhanden war, eine Aktivierung allerdings nur bei gleichzeitiger Präsenz des Liganden, also des Glucocorticoids Dexamethason, erfolgte, ließ sich dadurch der synergistische Effekt beider Substanzen erklären. Die Aktivierung des GR wurde anhand des Phosphorylierungsstatus des Proteins analysiert. Studien hatten nachgewiesen, dass die Phosphorylierung an Position Ser211 mit einer vorrangig nukleären Lokalisation des GR einherging und dass die Phosphorylierung an dieser Stelle mit einer ausgeprägten Transaktivierungskapazität korrelierte (Blind & Garabedian, 2008; Wang *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu waren GR-Moleküle, die an Ser203 phosphoryliert waren, vornehmlich im Cytosol zu finden. In HT-29/B6-GR-Zellen konnte gezeigt werden, dass der Anteil aktivierter GR-Moleküle, die an Position Ser211 phosphoryliert waren, unter dem Einfluss von Dexamethason konstant blieb, unabhängig davon, ob mit TNF- α inkubiert wurde oder nicht. Somit ließ sich die Aussage treffen, dass

ausschließlich das Gesamtproteinniveau des Rezeptors erhöht wurde, nicht aber sein Aktivierungsgrad gesteigert war.

Dass sich bei der Immunodetektion des GR im Western Blot stets eine weitere Bande mit einem etwas höheren Molekulargewicht zeigte (siehe Abb. 3. 10A), warf die Frage auf, ob diese Bande möglicherweise eine weitere Isoform des GR oder auch posttranslational modifizierten GR repräsentieren könnte. Wie in Abschnitt 1. 6. 1 (II) bereits beschrieben unterliegt der GR verschiedenen posttranslationalen Modifikationen (Zhou & Cidlowski, 2005). Ein in einem Ubiquitierungs-Zielmotiv (PEST-Sequenz) gelegener Lysinrest (K426) dient hier als kovalentes Verknüpfungstarget für E2/E3-Ubiquitinligasen (Wallace & Cidlowski, 2001). Auch eine Sumoylierung wurde für das Protein nachgewiesen, wobei deren Effekt auf die Transaktivierung des Rezeptors noch umstritten ist (Le Drean *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2002). Es ist möglich, dass im Rahmen der beschriebenen Versuche eine derartig modifizierte Form nachgewiesen wurde. Allerdings erscheint diese Möglichkeit nicht wahrscheinlich, da sich bei starker Variation des Gesamtniveaus des GR die Intensität dieser höhermolekularen Bande nicht änderte. Die Isoform GR- α -A stellt die klassische Isoform des GR- α dar. Sie ist die Isoform mit der höchsten Aminosäurezahl und repräsentiert das hauptsächlich generierte Proteinprodukt. Neben der *Full Length*-Variante GR-A werden weitere kürzere Isoformen unter der Verwendung verschiedener Translationsstartpunkte gebildet (GR- α -B/C/D) (Duma *et al.*, 2006). So könnte die höhermolekulare Bande auch GR- α -A darstellen, so dass die Hauptbande unter dieser Annahme GR- α -B repräsentieren würde. Diese beiden Isoformen unterscheiden sich um 27 Aminosäuren (entsprechend 3 kDa). Im Hinblick auf die GRE-abhängige Transaktivierung repräsentiert GR- α -B die effizientere Isoform (Yudt & Cidlowski, 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch keine weitere Charakterisierung der GR-Isoformen vorgenommen. Es ist aber wegen der konstanten Intensität der höhermolekularen Bande und weil GR- α -A als das Hauptproteinprodukt angesehen wird, anzunehmen, dass die Hauptbande des GR hier GR- α -A repräsentiert. Die weitere beobachtete Bande ist somit eher auf eine unspezifische Bindung des polyklonalen GR-Antikörpers zurückzuführen.

Das gesteigerte Gesamtproteinniveau des GR korrespondierte mit einem erhöhten mRNA-Level des GR unter der Einwirkung von TNF- α . Nach Ausschluss einer transkriptionellen Steigerung per Genreporter-Assay konnte mittels Real-time RT-PCR eine verlängerte Halblebensdauer der GR-mRNA als Ursache nachgewiesen werden. Die Regulation des GR auf der Ebene der mRNA-Lebensdauer wurde bereits als eine der möglichen Regulationsformen des GR beschrieben. So wurde beispielsweise die mRNA-Halblebenszeit des GR in Hepatomzellen der Ratte von 4 auf 10 Stunden gesteigert, nachdem die Zellen mit 8-Bromo-cAMP inkubiert worden waren (Dong *et al.*, 1989). Diese Steigerung spiegelte sich

in diesem Zellsystem sowohl in einer Erhöhung des Proteinniveaus des Rezeptors als auch in der Induktion GR-abhängiger Gene wider.

Die vorliegenden Ergebnisse stellen zum ersten Mal speziell einen Zusammenhang zwischen TNF- α und einer verlängerten mRNA-Halblebenszeit des GR her. Der Mechanismus der Steigerung der Halblebensdauer zahlreicher anderer mRNAs durch TNF- α wurde bereits beschrieben. In humanen Colonzellen (HT-29) zeigte sich, dass die Stimulation mit TNF- α die Stabilität des Transkripts des polymeren Ig-Rezeptors erhöhte (Bruno & Kaetzel, 2005). In murinen Makrophagen ergab sich ein ähnliches Phänomen für den *Suppressor of Cytokine Signaling* (SOCS3). In diesem Fall rührte die Beobachtung von der Existenz dreier Adenosin/Uridin-reicher Elemente (ARE) im 3'-UTR der mRNA her. Diese Sequenzen stellen jeweils Pentamere der Abfolge AUUUA dar. An derartige Bereiche können entweder destabilisierende (z.B. KSRP, TTP) oder stabilisierende (z.B. HuR) Faktoren binden, die wiederum direkt oder indirekt mit den für den mRNA-Abbau zuständigen Proteinkomplexen interagieren (Shaw & Kamen, 1986). So wird der Abbau in der 3'→5'-Richtung vom sog. Exosom katalysiert, während von 5'→3' der Abbau durch Xrn1 erfolgt.

Weiter kann es beim mRNA-Abbau auch zunächst zu einer internen Spaltung des Transkripts aufgrund einer Endonukleaseaktivität kommen, woraufhin dann die Degradation der entstehenden Fragmente erfolgt (Garneau *et al.*, 2007). In diesem Fall können Sequenzen innerhalb des kodierenden Bereichs der mRNA entscheidend für die Stabilität des Transkripts sein. Es wurde beschrieben, dass derartige spezifische *Coding Region Determinants* (CRD) durch Bindung des *CRD-Binding Protein* (CRD-BP) die betreffende mRNA vor der Spaltung durch Endonukleasen bewahren können (Ioannidis *et al.*, 2003; Ross, 1995; Sparanese & Lee, 2007; Wisdom & Lee, 1991). Ein solcher Mechanismus könnte im Zusammenhang mit den Beobachtungen zur mRNA des Glucocorticoidrezeptors im humanen Colon relevant sein. Da bei der stabilen Transfektion der HT-29/B6-Zellen mit der cDNA des GR hauptsächlich der kodierende Bereich für die Transfektion genutzt wurde und größere Teile der 5'- und 3'-UTRs der GR-mRNA nicht enthalten waren, ist anzunehmen, dass der beobachtete Effekt der verlängerten mRNA-Lebensdauer über Sequenzbereiche vermittelt wird, die innerhalb des kodierenden Bereiches lokalisiert sind (Zeissig *et al.*, 2006). Eine Charakterisierung der dafür entscheidenden Sequenzabschnitte im Falle der GR-mRNA steht in diesem Zusammenhang noch aus und könnte jederzeit in zukünftigen Studien durch Deletions- bzw. Mutationsanalysen erfolgen.

Ein weiterer denkbarer Mechanismus der Steigerung der mRNA-Lebensdauer des GR durch TNF- α wäre der Einfluss von mikro-RNAs (miRNA) (de Kloet *et al.*, 2009). Diese aus ~22 Nukleotiden bestehenden nicht-kodierenden RNA-Moleküle können die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene beeinflussen, wenn sie an komplementäre Bereiche ihrer Ziel-

mRNAs gebunden haben (Wu & Belasco, 2008). Die Regulation erfolgt anschließend entweder durch eine Repression der Translation der betreffenden mRNA oder durch eine Regulation des mRNA-Abbaus. In tierischen Zellen treten fast immer nur partiell komplementäre miRNAs auf, welche eine Entfernung des poly-(A)-Schwanzes der mRNA einleiten, woraufhin es zu einem Abbau des gesamten Moleküls kommt. Im Falle des GR ist bekannt, dass die miRNA 18a in neuronalen Zellen in Abhängigkeit von Stressstimuli zu einer translationalen Repression des GR führt (Uchida *et al.*, 2008). Weiter wurde eine Herabregulation des GR durch die miRNA 124a und 18 in Zellen des Hippocampus und der Hypophyse nachgewiesen, wobei hier nicht aufgeklärt wurde, ob ein Einfluss auf den RNA-Abbau oder den Translationsvorgang bestand (Vreugdenhil *et al.*, 2009). Ob diese oder andere miRNAs in Colonzellen eine Rolle bei der Lebensdauerverlängerung der mRNA des GR spielen, müsste durch den Nachweis der Repression der betreffenden miRNAs in Abhängigkeit von TNF- α geklärt werden. Dass TNF- α einen Einfluss auf die Expression bestimmter miRNAs haben kann, wurde vor dem Hintergrund der Regulation inflammatorischer Prozesse bereits beschrieben (Bazzoni *et al.*, 2009).

4. 1. 3 Wechselwirkung der Glucocorticoid- und TNF- α -abhängigen Signaltransduktion

Die meisten Studien zur Wechselwirkung zwischen GC- und TNF- α -abhängigen Signalen beschreiben antagonistische Effekte. Diese wurden zumeist auf die negative gegenseitige Beeinflussung des aktivierten GR und TNF- α -abhängigen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder AP-1 zurückgeführt (Adcock & Caramori, 2001). Allerdings existieren auch einige Beispiele für kooperative Wechselwirkungen dieser beiden Signalwege. Zu diesen zählt die Induktion von Proteinen, die u.a. bei der angeborenen Immunantwort und dem programmierten Zelltod eine Rolle spielen.

So wurde in der Lungenepithelzelllinie A549 eine synergistische Induktion des Toll-like receptor 2 (TLR-2) durch Dexamethason und TNF- α nachgewiesen (Hermoso *et al.*, 2004). Eine Microarray-Studie in A549-Zellen zeigte weiterhin eine synergistische Induktion des Cellular Inhibitor of Apoptosis-2 (c-IAP2) (Webster 2002). Auch die Expression der Akute-Phase-Proteine SAA1 (Serum Amyloid A 1) und SIP24/24p3 unterlagen einem derartigen Synergismus (Liu *et al.*, 2003; Thorn *et al.*, 2003). Eine Studie an Obesitas-Patienten konnte unter Verwendung von Fettgewebeproben eine verstärkte Produktion des Peptidhormons Leptin bei gleichzeitiger Stimulation mit Dexamethason und TNF- α nachweisen. Bei diesem Phänomen wurde sowohl das mRNA-Niveau als auch das Niveau an sezerniertem Leptin gesteigert, wobei der MAP-Kinase p38 eine Schlüsselrolle zukam (Trujillo *et al.*, 2006).

Ähnlich den sich negativ auswirkenden Interaktionen zwischen dem GR und den durch TNF- α aktivierten Transkriptionsfaktoren im Falle der antagonisierenden Wirkung stellten sich auch die kooperativen Effekte oftmals als Resultat solcher Proteininteraktionen heraus. So wurde mit Hilfe von Promotorstudien gezeigt, dass bei der synergistischen Induktion von TLR-2 und c-IAP-2 die Existenz bestimmter NF- κ B-Bindestellen und GRE-Sequenzen in der Promotorregion beider Gene essentiell für die Vermittlung der beschriebenen Effekte waren (Hermoso et al., 2004; Webster et al., 2002). Im Falle des TLR-2 war weiterhin ein STAT-Bindeelement von Bedeutung. Aufgrund dieser Beobachtungen war hier eine positive Interaktion der betreffenden Transkriptionsfaktoren in unmittelbarer Nähe zum Transkriptionsstartpunkt anzunehmen. Bemerkenswert dabei ist, dass in diesen Fällen daher von kooperativen Wechselwirkungen zwischen GR und den sonst häufig von ihm antagonisierten Transkriptionsfaktoren auszugehen ist. Ähnliche Beobachtungen wurden schon bei der Induktion des NT/N-Gens (Neurotensin/Neuromedin N) in neuroendokrinen PC12-Zellen gemacht, bei der eine Glucocorticoid-Stimulation zu einer Steigerung der AP-1-abhängigen Expressionsinduktion führte (Harrison et al., 1995).

Bezüglich der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Wechselwirkung von GC- und TNF- α abhängiger Signaltransduktion konnte eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ausgeschlossen werden. Dies geschah durch den Einsatz des I κ B- α -Kinase-Inhibitor BAY11-7082, der weder die synergistische Induktion des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms noch die Expressionssteigerung des ENaC inhibierte. Vielmehr wurde im Zusammenhang mit dem beschriebenen Effekt zum ersten Mal eine kooperative Wirkung von GC und TNF- α auf das Expressionsniveau eines der beteiligten Rezeptoren und im speziellen auf die Verlängerung der mRNA-Halblebenszeit des GR zurückgeführt (Bergann et al., 2009b).

Bei näherer Charakterisierung der involvierten Signalmoleküle konnte durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren ebenfalls die Beteiligung von TNF- α -aktivierten MAP-Kinasen auf die MAP-Kinase p38 eingegrenzt werden. Sowohl die Induktion von ENaC-Aktivität und -Expression als auch die TNF- α -vermittelte Steigerung der GR-Niveaus war durch den p38-Inhibitor SB202190 hemmbar. Im Gegensatz dazu konnte eine Rolle von JNK und ERK ausgeschlossen werden. Schon früher wurde p38 in Zusammenhang mit synergistischen Effekten von GC und TNF- α gebracht. So zeigte sich, dass die Steigerung der Leptin-Expression in Fettgewebe mit einem Anstieg der p38-Aktivität einherging (Trujillo et al., 2006). Die Inhibition der p38 konnte auch hier den beobachteten Effekt verhindern, allerdings wurde in dieser Studie nicht näher charakterisiert, ob dem gesteigerten mRNA-Niveau auch eine verlängerte Halblebenszeit des Moleküls zugrunde lag. Es ist bekannt, dass p38 die Stabilität bestimmter mRNAs ändern kann, indem sie die Phosphorylierung und Aktivierung von mRNA-Bindeproteinen beeinflusst (Garneau et al., 2007). So wurde für ein Substrat der p38, die MAPKAPK-2, gezeigt, dass sie zur Phosphorylierung von TPP und KSRP beitragen

kann, was zu einer verminderten Bindung an AU-reiche Elemente und so einer Steigerung der Stabilität der mRNA führen kann (Briata *et al.*, 2005; Sandler & Stoecklin, 2008; Tudor *et al.*, 2009). In Übereinstimmung damit wurde schon im Zusammenhang mit der Stabilisierung der mRNA von SOCS3 durch TNF- α gezeigt, dass eine Aktivierung der MKK6/p38-Kaskade essentiell für diesen Effekt ist (Ehltung *et al.*, 2007).

Dass der durch p38 vermittelte Effekt bezogen auf die Regulation des GR in HT-29/B6-GR-Zellen auf der mRNA-Ebene und nicht post-translational durch Phosphorylierung eintrat, wurde durch die Analyse des GR-Proteingehalts sowie des Phosphorylierungsstatus bestätigt. Des Weiteren kam es nur in Gegenwart von TNF- α zu einer Aktivierung der p38, wohingegen Dexamethason allein die Kinaseaktivität nicht stimulierte (Daten nicht gezeigt). Da die p38-Inhibition nicht den prozentualen Anteil an Ser211-phosphoryliertem GR beeinflusste, ist davon auszugehen, dass die p38 nicht die für die Phosphorylierung an dieser Aminosäure verantwortliche Kinase ist. Es existieren mehrere Kinasefamilien, für die eine Phosphorylierung des GR demonstriert worden ist. Neben den MAP-Kinasen zählen zu diesen die *Cyclin-Dependent Kinases* (CDK) und auch die *Glycogen Synthase Kinase-3* (GSK-3) (Itoh *et al.*, 2002; Krstic *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2005; Rogatsky *et al.*, 1998b). Generell wurde das *Cross-talk* zwischen MAP-Kinasen und GC-abhängiger Signaltransduktion häufig als antagonistisch beschrieben. Die Phosphorylierung des GR durch JNK und ERK inhibierte die Funktion des GR und führte zum erleichterten Export des GR aus dem Zellkern (Itoh *et al.*, 2002; Rogatsky *et al.*, 1998a). In HeLa-Zellen wurde die Liganden-Bindedomäne des GR als Zielregion der p38 identifiziert und nicht die AF1, in der Ser211 zu finden ist (Szatmary *et al.*, 2004). Allerdings wurde auch nachgewiesen, dass in lymphoiden Zellen die p38 zur Phosphorylierung des GR an Position Ser211 führen kann und damit eine Aktivierung des Moleküls einherging (Miller *et al.*, 2005). Krstic und Mitarbeiter zeigten für den GR der Ratte eine CDK-vermittelte Phosphorylierung von Ser232, das mit dem Ser211 des humanen GR korrespondiert (Krstic *et al.*, 1997). Angesichts der Diversität der beteiligten Kinasen und der Aminosäurereste des GR, die als Ziele der post-translationalen Modifikationen beschrieben sind, und unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen ist davon auszugehen, dass in HT-29/B6-GR-Zellen eine andere Kinase als p38 für die GC-abhängige Phosphorylierung des GR an Ser211 ursächlich verantwortlich war.

Resultierend aus den Analysen zu den Mechanismen, die der synergistischen Induktion des ENaC durch TNF- α und Dexamethason zugrunde liegen, ließ sich das in Abb. 4.1 (S. 100) präsentierte mechanistische Modell ableiten, welches sich am Ende der vorliegenden Diskussion findet und eine Zusammenführung beider Projektteile dieser Promotionsarbeit darstellt.

Ein erster Anhaltspunkt für die unterschiedliche Beeinflussung von Glucocorticoid- und Mineralocorticoid-abhängiger Induktion des ENaC durch TNF- α wurde durch diese Analyse der Beteiligung der Signalwege geliefert. *Ex vivo*-Untersuchungen an nicht entzündeten Gewebearealen von an Morbus Crohn erkrankten Patienten zeigten, dass auch dort der Aldosteron-induzierte elektrogene Na⁺-Transports vermindert war. Dieses Phänomen erwies sich als TNF- α -abhängig. Bei näherer Charakterisierung beteiligter Signaltransduktionswege stellte sich eine entscheidende Rolle der TNF- α -aktivierten MAPK ERK-1/2 für diesen inhibitorischen Effekt heraus, während eine Beteiligung von anderen TNF- α -abhängigen Signalproteinen wie der MAPK p38 oder JNK ausgeschlossen werden konnte (Zeissig *et al.*, 2008). Der kooperative Effekt, der im Rahmen dieser Arbeit zwischen Glucocorticoiden und TNF- α im distalen Rattencolon und an HT-29/B6-GR-Zellen beobachtet werden konnte, war hingegen unabhängig von ERK1/2, sondern wurde wie beschrieben durch die MAPK p38 vermittelt und die beobachtete Regulation lief auf der Ebene der GR-Expressionsregulation ab. Es ist möglich, dass es durch die inhibitorische Wirkung von TNF- α auf die MR-abhängige ENaC-Expression zu einer wechselseitigen Antagonisierung des aktivierten MR mit TNF- α /ERK1/2-abhängigen Transkriptionsfaktoren kommt. Für den MR sind die Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren weniger gut charakterisiert als für den GR. *In vitro* wurde bislang gezeigt, dass der MR und NF- κ B sich gegenseitig negativ beeinflussen. Eine Interaktion von AP-1 und dem MR war hingegen nicht nachweisbar (Kolla & Litwack, 2000a; Pearce & Yamamoto, 1993; Stockand, 2002). Eine potentielle negative wechselseitige Regulation des MR und eines ERK1/2-abhängigen Transkriptionsfaktors wie beispielsweise Elk-1 oder c-Fos könnte daher Gegenstand zukünftiger Studien sein (Shaul & Seger, 2007).

4. 1. 4 Bedeutung des Synergismus von GC und TNF- α für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Bezogen auf die Pathomechanismen bei CED wurde TNF- α als ein wichtiger Faktor der Fehlregulation von Barriere- und Transportfunktionen identifiziert (Amasheh *et al.*, 2004; Schmitz *et al.*, 1999). Die bei CED häufig therapeutisch eingesetzten GC führen zum schnellen Abklingen der CED-Symptomatik, u.a. auch der ausgeprägten Diarrhoen. Dies wurde u. a. auf einen signifikanten Anstieg der Na⁺- und Wasserresorption nach der Gabe von GC zurückgeführt, der bereits 5 h nach einmaliger intravenöser Verabreichung von GC beobachtet werden konnte (Hawker *et al.*, 1980; Sandle *et al.*, 1986). So konnten Sandle *et al.* durch rektale Dialyse zeigen, dass die basale Netto-Natriumresorption, die im gesunden Darm einen durchschnittlichen Wert von $2,5 \pm 0,6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ aufweist, bei aktiver Colitis Ulcerosa auf einen Wert von $0,0 \pm 0,7 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ ($p < 0,025$) reduziert ist. Bei einer Corticoid-

behandelten Gruppe von CU-Patienten konnte die basale Natriumresorption signifikant gesteigert werden von $0,1 \pm 0,5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ auf $2,6 \pm 0,8 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ ($p < 0,02$) im Falle von 100 mg Hydrocortison-Hemisuccinat (Hawker *et al.*, 1980; Sandle *et al.*, 1986). Zu qualitativ ähnlichen Resultaten kam die Studie von Hawker *et al.*, bei der eine Gruppe von CED-Patienten untersucht wurde, die sich aus MC- und CU-Patienten zusammensetzte. Hier wurde die reduzierte Netto-Natriumresorption auf einen geschwächten Natriumflux von mukosal nach serosal eingegrenzt, der sich in Corticosteroid-behandelten Patienten wieder auf Normalniveau ansiedelte (Hawker *et al.*, 1980; Sandle *et al.*, 1986). Das anti-diarrhoische Potential der GC lässt sich also einerseits durch ihren generellen anti-inflammatorischen Effekt erklären und andererseits mit ihrer direkten Wirkung auf den Na^+ - und Wassertransport des Darmes begründen, die sie trotz der entzündlichen Umgebung bei CED entfalten können.

In diesem Zusammenhang konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bezogen auf die Induktion des ENaC demonstriert werden, dass die transkriptionelle Induktion des ENaC durch GC nicht nur durch die Präsenz des pro-inflammatorischen Zytokins $\text{TNF-}\alpha$ unbeeinflusst blieb, sondern dass $\text{TNF-}\alpha$ sogar einen positiven Effekt auf die GR-vermittelte ENaC-Induktion ausübte. Auf diese Weise lässt sich feststellen, dass $\text{TNF-}\alpha$ sowohl schädigende als auch förderliche Eigenschaften im Zusammenhang mit den Pathomechanismen von CED und ihrer Therapie aufweist. Sein förderlicher Effekt auf den GC-induzierten elektrogenen Na^+ -Transport stellt somit eine mögliche Erklärung für die schnellen resorptionssteigernden Effekte von GC bei CED dar (Hawker *et al.*, 1980; Sandle *et al.*, 1986).

Wegen seiner schädigenden Eigenschaften stellt eine mögliche Therapieform bei CED die Verabreichung von Anti- $\text{TNF-}\alpha$ -Antikörpern dar, die $\text{TNF-}\alpha$ binden und so seine Bindung an den TNF- Rezeptor blockieren (Wong *et al.*, 2008). Durch diese Bindung könnte auch die resorptionsteigernde Wirkung von $\text{TNF-}\alpha$ in Kombination mit Dexamethason verhindert werden. Da aber die Therapie mit Anti- $\text{TNF-}\alpha$ -Antikörpern zumeist als alternative Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit fehlendem Ansprechen auf konventionelle GC-Therapie eingesetzt wird, ist hier die anti-inflammatorische Wirkung der Antikörpertherapie ausschlaggebend (Price *et al.*, 2008; Rutgeerts *et al.*, 2005).

Die in unserer Studie eingesetzte Dosis an $\text{TNF-}\alpha$ von 10.000 U/ml korrespondierte mit einer Konzentration von 500 ng/ml. Eine geringere Dosis von 125 ng/ml wurde ebenfalls im Hinblick auf die synergistische Steigerung der GR-abhängigen Transaktivierung getestet und erbrachte vergleichbare Ergebnisse. Als diese Dosierung mit im Entzündungsfall in der intestinalen Mukosa vorhandenen Konzentrationen an $\text{TNF-}\alpha$ verglichen werden sollte, zeigte sich, dass bislang nur Serumkonzentrationen von $\text{TNF-}\alpha$ bestimmt worden sind. Ursächlich dafür ist die in der intestinalen Mukosa schwer bestimmbare Proteinkonzentration von TNF-

α . Für die Serumkonzentrationen existieren darüber hinaus eine Reihe verschiedener Werte in der Literatur. Komatsu *et al.* bestimmten eine Serum-TNF- α -Konzentration von 8 pg/ml in CED-Patienten im Vergleich zu 0,02 pg/ml in Kontrollpersonen (Komatsu *et al.*, 2001). Demnach war der Serumspiegel von TNF- α in Serum von CED-Patienten stark erhöht, allerdings ist davon auszugehen, dass die lokale Konzentration in der Mukosa den Serumspiegel bei weitem übersteigt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass der in dieser Arbeit beobachtete synergistische Mechanismus von Dexamethason und TNF- α auf den elektrogenen Na⁺-Transport im Colon eine Erklärung für die rasche resorptionssteigernde (und antidiarrhoische) Wirkung von Glucocorticoiden bei der Therapie von CED darstellt. Die Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus ergab eine Steigerung der mRNA-Lebensdauer des GR durch TNF- α , die ein erhöhtes Proteinniveau des GR nach sich zog. Die parallele Aktivierung des GR durch Dexamethason verursachte eine verstärkte Transkription der ENaC-Untereinheiten β und γ und resultierte in einem erhöhten ENaC-vermittelten Na⁺-Transport.

4. 1. 5 Wechselwirkung weiterer CED-Zytokine mit der GC-vermittelten Signaltransduktion

Die Untersuchung der Wirkung weiterer bei CED vermehrt vorhandener Zytokine auf die GC-abhängige Transaktivierung mittels Reportergen-Assay ergab einen antagonistischen Effekt für das Schlüsselzytokin der Colitis ulcerosa IL-13 und auch für das bei Morbus Crohn erhöhte IFN- γ . Die meisten Zytokin-abhängigen Signale werden durch den Jak-STAT-(*Janus Kinase Signal Transducer and Activator of Transcription*-) Signalweg vermittelt (Rogatsky & Ivashkiv, 2006). IL-13 vermittelt die von ihm ausgelösten zellulären Effekte zumeist über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6 (Matsukawa, 2007). Die Herabregulation der GR-Transaktivierung durch IL-13 in HT-29/B6-GR-Zellen stimmt mit der Beobachtung überein, dass der aktivierte STAT6 die GRE-abhängige Transaktivierung durch den GR in cytotoxischen T-Zellen (CTLL2) senkte (Biola *et al.*, 2000). Hingegen wurde auch gezeigt, dass zwischen STAT6 und dem GR auch kooperative Wechselwirkungen bestehen können, da die STAT6-abhängige Induktion der β -Casein-mRNA in Brustepithelzellen (HC11), COS7-Zellen und CTLL2-Zellen durch Aktivierung des GR verstärkt wurde (Chida *et al.*, 1998; Moriggl *et al.*, 1997). Im Zusammenhang mit der Barriereförderung bei CED wurde gezeigt, dass IL-13 an der Induktion des porenbildenden Claudin-2 beteiligt ist. In HT-29/B6-Zellen reduzierte dieses Zytokin den transepithelialen Widerstand und steigerte weiterhin die Apoptoserate dieser Zellen (Heller *et al.*, 2005; Heller *et al.*, 2008). Die inhibitorische Wirkung von IL-13 auf die steroidabhängige ENaC-Induktion könnte ebenfalls zu den Pathomechanismen der CED beitragen. In zukünftigen Analysen sollte daher die Möglichkeit

einer IL-13-vermittelten Hemmung der ENaC-Induktion durch Corticosteroide charakterisiert werden. Dabei könnte neben dem GR auch die MR-induzierte ENaC-Transaktivierung untersucht werden. Zu diesem Zweck kann das in dieser Arbeit generierte Zellmodell HT-29/B6-Tet-On-MR herangezogen werden.

Während sich IFN- γ bezogen auf die GR-Aktivität also als inhibitorisch erwies, hatten frühere Studien zur MC-abhängigen ENaC-Induktion keine hemmende Wirkung von IFN- γ gezeigt (Amasheh *et al.*, 2004; Barmeyer *et al.*, 2004a). Keine relevante Modulation der GR-abhängigen Transaktivierung ergab sich auch durch die Zytokine IL-8 und IL-1 β . Bezogen auf die Induktion des ENaC durch Aldosteron wurde im distalen Rattencolon eine inhibitorische Wirkung von IL-1 β demonstriert (Barmeyer *et al.*, 2004a). Auch für die Zytokine IFN- γ und IL-1 β scheint demnach eine differentielle Regulation von MC- und GC-vermittelter Signaltransduktion zu existieren. Allerdings steht hier für beide Zytokine eine weitere Charakterisierung der Auswirkung auf die GC-induzierte Transkription der ENaC-Untereinheiten β und γ noch aus. Eine kooperative Wirkung ähnlich der des TNF- α konnte für das Zytokin IL-6 demonstriert werden. Hier steigerte die Inkubation mit dem Zytokin die GR-vermittelte Transaktivierung in HT-29/B6-GR-Zellen. Im Folgenden zeigte die Analyse des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms in gleichartig behandelten Zellen, dass auch der ENaC-vermittelte Na⁺-Transport einer synergistischen Induktion durch Dexamethason und IL-6 unterlag. Vom Zytokin IL-6 ausgelöste Signale werden zumeist durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 vermittelt. Von diesem Transkriptionsfaktor ist bekannt, dass seine Wechselwirkung mit dem aktivierten GR ausschließlich zu positiven Effekten bezogen auf die Transkription des jeweils analysierten Gens führte (Zhang *et al.*, 1997). Der beschriebene Effekt in HT-29/B6-GR-Zellen reiht sich demnach in eine Reihe gleichartiger Phänomene ein (Rogatsky & Ivashkiv, 2006). Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass TNF- α nicht das einzige pro-inflammatorische Zytokin ist, das imstande ist, die resorptionssteigernde Wirkung von Glucocorticoiden im humanen Colon zu verstärken. Auch die positiven Effekte von IL-6 auf die GR-abhängige Transaktivierung bzw. ENaC-Induktion könnten daher Gegenstand zukünftiger Analysen werden. Bisher wurde für eine Vielzahl von Zelllinien beschrieben, dass der aktivierte GR und STAT3 wechselseitig ihre Wirkung potenzieren. Dabei wurde eine Zusammenlagerung der beiden Proteine in einem Aktivatorkomplex nachgewiesen, welcher in der Lage war, sowohl die GRE- als auch die IL-6-*Responsive Element*-abhängige Transkription zu verstärken (Zhang *et al.*, 1997). Weiterhin wurde die direkte Interaktion der beiden Proteine demonstriert und die Hypothese aufgestellt, dass die Verweildauer jedes Transkriptionsfaktors an den betreffenden Promotoren durch den zweiten Transkriptionsfaktor wechselseitig verlängert wird (Lerner *et al.*, 2003). Welcher Mechanismus der kooperativen Regulation von IL-6 und GC in HT-29/B6-GR-Zellen zugrunde liegt, bedarf noch der näheren Charakterisierung. Ob daran vergleichbar mit den

durch TNF- α vermittelten Effekten die Regulation des GR-Niveaus oder eine Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren beteiligt ist, könnte durch Genreporter-Studien mit dem IL-6-*Responsive Element* und Co-Immunopräzipitationsexperimenten ergründet werden.

4.2 Charakterisierung des Aldosteron-induzierten elektrogenen Na⁺-Transports via ENaC im Zellmodell

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein Aldosteron-sensitives epitheliales Colonzellmodell generiert und charakterisiert. Dies geschah vor dem Hintergrund des Mangels eines epithelialen Zellsystems, in dem funktionell aktiver ENaC durch Mineralocorticoide im nanomolaren Konzentrationsbereich induziert werden kann. Angestrebt wurde dies zum Zweck der Differenzierung der durch kurzkettige Fettsäuren bzw. durch Mineralocorticoide hervorgerufenen Effekte auf ENaC-Transkription und -Targeting und der Untersuchung der Modulation der Aldosteron-vermittelten ENaC-Induktion durch pro-inflammatorische Zytokine.

4.2.1 Generierung eines MR-exprimierenden epithelialen Modells humaner Colonzellen

Zur Untersuchung der oben genannten Fragestellungen wurde eine Colonepithelzelllinie generiert, welche einen funktionell aktiven Mineralocorticoidrezeptor (MR) exprimiert. Zu diesem Zweck wurde die cDNA des humanen MR mithilfe des *Tet-On[®] Inducible Gene Expression Systems* in HT-29/B6-Zellen eingebracht. Die induzierbare Expression des MR sowie seine Funktionalität wurden mittels Western Blot und Reporteragen-Assay nachgewiesen. Eine MR-vermittelte Transaktivierung konnte im generierten Zellklon durch Inkubation mit Aldosteron im nanomolaren Konzentrationsbereich induziert werden.

Von besonderem Interesse war die Charakterisierung des elektrogenen Na⁺-Transports in Abhängigkeit des Mineralocorticoidhormons Aldosteron. Bei der Analyse der Induktion von ENaC-vermitteltem Na⁺-Transport wurde offenbar, dass nur die Kombination kurzkettiger Fettsäuren (Butyrat) und Aldosteron in nanomolaren Dosen einen signifikanten Amilorid-sensitiven Kurzschlussstrom hervorrufen konnte, während die Inkubation mit Aldosteron allein keinen solchen Effekt zeigte. Diese Ergebnisse stimmten mit früheren Studien zum ENaC-vermittelten Na⁺-Transport unter dem Einfluss von Butyrat überein, welche ergeben hatten, dass Butyrat die ENaC-Untereinheiten β und γ auf transkriptioneller Ebene induziert und dass ein signifikanter Amilorid-sensitiver Kurzschlussstrom bei gleichzeitiger Stimulation mit Corticosteroiden zustande kommt (Zeissig *et al.*, 2007).

Weiterhin unterstützten die im HT-29/B6-Tet-On-MR-Klon gemachten Beobachtungen die Einschätzung, dass die mangelnde Expression von Corticosteroidrezeptoren (GR und MR) in HT-29/B6-Zellen ursächlich für ihre ENaC-Defizienz ist (Mick *et al.*, 2001; Zeissig *et al.*, 2006). In HT-29/B6-GR-Zellen konnte entsprechend nach der stabilen Transfektion mit dem humanen GR durch Inkubation mit Dexamethason binnen 72 h eine signifikante ENaC-vermittelte Na⁺-Transportrate stimuliert werden (Zeissig *et al.*, 2006). In der Schleimhaut des Colon steigt die Expression des MR während der Zelldifferenzierung an, die während der Wanderung der Zellen entlang der Achse zwischen Krypten und Epitheloberfläche erfolgt. Das höchste Expressionsniveau wird dabei in den Oberflächenepithelzellen erreicht (Schulman *et al.*, 1994). Bei colorektalen Karzinomen wurde eine Reduktion der MR-Expression schon als frühes Ereignis der neoplastischen Transformation beschrieben. Diese geht mit einer gesteigerten Expression von Proteinen einher, welche für die Angiogenese relevant sind, die ihrerseits essentiell für die Tumorausbildung ist (Di Fabio *et al.*, 2007). So ist anzunehmen, dass der Verlust der endogenen MR-Expression in HT-29/B6-Zellen mit größter Wahrscheinlichkeit auf die neoplastischen Veränderungen zurückzuführen ist.

Auch für den aktivierten MR wird angenommen, dass er seine Wirkung hinsichtlich der transkriptionellen Induktion von β - und γ -ENaC in Colonzellen durch die Bindung an ein HRE (*Hormone Response Elements*) in einiger Entfernung vom proximalen Promotorbereich entfaltet (Thomas *et al.*, 2002). Die im Folgenden aus α -, β - und γ -Untereinheiten zusammengesetzten ENaC-Kanäle gelangen in die apikale Membran und vermitteln dort den Na⁺-Einstrom. Übereinstimmend damit ergab die Analyse mittels Real-time RT-PCR einen Anstieg der Expression von β - und γ -ENaC. Während es unter Aldosteron und unter Butyrat jeweils zu einer Expressionssteigerung von etwa vergleichbarem Ausmaß kam, wurde das mRNA-Niveau unter der Kombination beider Induktoren auf ein überadditives Level erhöht. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass das Ausmaß der ENaC-Induktion durch Aldosteron allein nicht ausreichte, um detektierbare Na⁺-Transportraten zu generieren.

Die Induktion der ENaC-Transkription im neu generierten Zellmodell HT-29/B6-Tet-On-MR bestätigte die früheren Studien zum resorptionssteigernden Effekt von Butyrat (Amin *et al.*, 2007; Zeissig *et al.*, 2007). In diesen Arbeiten wurde gezeigt, dass Butyrat neben der ENaC-Transkription auch den elektroneutralen Na⁺-Transport durch Induktion der NHE3-Transkription steigerte. Diese Daten offenbaren einen zusätzlichen Mechanismus, der den erfolgreichen therapeutischen Einsatz von Butyrat-Klysmata bei CED erklärt (Scheppach *et al.*, 1992). Bisher wurde der Therapieerfolg von Butyrat zumeist mit seiner anti-inflammatorischen Wirkung in Verbindung gebracht. Für Biopsie-Präparate von Patienten, die an Morbus Crohn (MC) litten, wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Butyrat zu einer Verringerung der NF- κ B-Aktivität führte, wodurch eine Senkung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine hervorgerufen wurde (Inan *et al.*, 2000; Segain *et al.*, 2000).

Weiter konnte die Aktivität von NF- κ B in Lamina Propria-Makrophagen aus Patienten mit Colitis ulcerosa durch Butyratspülungen reduziert werden (Lührs *et al.*, 2002). Der ursächliche Mechanismus dafür wird in einem gehemmten Abbau des NF- κ B-Inhibitor-Proteins I κ B α durch Butyrat vermutet (Segain *et al.*, 2000). Zusätzlich zu diesem anti-inflammatorischen Effekt kann sich der resorptionssteigernde Effekt von Butyrat positiv beim therapeutischen Einsatz bei CED auswirken. Durch die Förderung von elektroneutralem und elektrogenem Na⁺-Transport könnte dem CED-bedingten Na⁺- und Wasserverlust sehr effektiv entgegengewirkt werden.

4. 2. 2 Steigerung des MR-Expressionsniveaus durch Butyrat

Wie auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen wurde, kann Butyrat in Colonzellen hinsichtlich der MR-Expression einen verstärkenden Effekt ausüben (Fukushima *et al.*, 1999). Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen. Dass die gesteigerte Expression unter dem Einfluss von Butyrat und Aldosteron im Vergleich mit alleiniger Inkubation mit Butyrat etwas weniger stark ausgeprägt war, ist mit größter Wahrscheinlichkeit einer negativen Autoregulation durch den Liganden geschuldet. Ähnliche Beobachtungen wurden für den MR u.a. schon in Nierenzellen der Ratte gemacht (Kalinyak *et al.*, 1992). Die gesteigerte Expression des MR unter dem Einfluss von Butyrat ließ vermuten, dass der stärker ausgeprägte Anstieg des mRNA-Levels von β - und γ -ENaC durch die größere Anzahl der für die Aldosteronbindung verfügbaren MR-Moleküle zustande kommt. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung einer verstärkten HRE-abhängigen Transaktivierung untermauert. Auch die Intensitätssteigerung des nukleären Signals des MR in der Immunfluoreszenzfärbung unter Butyrat und Aldosteron veranschaulicht und untermauert dieses Ergebnis. Die proximalen Promotorbereiche von β - und γ -ENaC, die parallel dazu im Genreporter-Assay untersucht wurden, zeigten eine Induktion durch Butyrat, die aber durch Aldosteron nicht weiter gesteigert werden konnte. Diese Beobachtung bestätigt die Ansicht, dass die Transaktivierung von β - und γ -ENaC durch Corticosteroidrezeptoren von weiter entfernten HRE-Sequenzen vermittelt wird (Thomas *et al.*, 2002).

Butyrat kann auf vielfältige Weise die Expression von Genen beeinflussen. Gut charakterisiert ist seine inhibitorische Wirkung auf Histondeacetylasen. Durch die Lysin-Acetylierung der Histone kommt es aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zwischen Acetylgruppen und DNA-Phosphatgerüst zu einer Verlagerung der N-Termini, so dass die Zugänglichkeit von DNA-Abschnitten für spezifische Transkriptionsfaktoren gesteigert werden kann. Es existiert aber auch eine Regulation durch Hyperacetylierung von Nicht-Histonproteinen oder durch Beeinflussung der DNA-Methylierung und der intrazellulären

Signaltransduktion über Kinasen (Cuff & Shirazi-Beechey, 2004). Es wurde außerdem beschrieben, dass Butyrat auch auf mRNA-Ebene in die Regulation der Genexpression eingreifen kann, indem entweder die mRNA-Stabilität oder ihre Elongation reguliert wird. Beispielsweise wurde die Lebensdauer der mRNA des Monocarboxylat-Transporters 1 (MCT1) durch Butyrat verlängert (Cuff *et al.*, 2002; Cuff & Shirazi-Beechey, 2004). Die Aufklärung der dem Anstieg der MR-Expression in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen unter Butyrat zugrunde liegenden Mechanismen steht noch aus. In zukünftigen Analysen könnte in diesem Zusammenhang eine Charakterisierung der Lebensdauer der MR-mRNA erfolgen. Auch wäre im Fall des MR eine Regulation über miRNAs denkbar. Es existieren in diesem Zusammenhang zwar noch keine experimentellen Daten, allerdings lieferte eine *in silico*-Analyse eine Vielzahl möglicher miRNA-Kandidaten, die eine Regulation auf den MR ausüben könnten (de Kloet *et al.*, 2009).

Hinsichtlich der Steigerung der MR-Expression durch Butyrat in der Colonzelllinie T84 und der Dünndarmzelllinie IEC-6 hatten Northern Blot-Analysen gezeigt, dass eine Induktion der MR-Expression auf mRNA-Ebene existiert. Diese erstreckte sich auch auf die Proteinebene (Fukushima *et al.*, 1999). Für den MR wurde dabei eine Kolokalisation mit Alkalischer Phosphatase nachgewiesen. Allerdings wurden in dieser Studie die Mechanismen, die zur Steigerung des mRNA-Niveaus des MR führten, nicht näher charakterisiert.

Der Effekt von Butyrat auf die MR-Expression unterstützt die Einschätzung, dass Butyrat neben seiner anti-inflammatorischen und anti-tumoralen Wirkung im Colon auch bei zellulären Differenzierungsvorgängen eine wichtige Rolle spielt. Wie bereits erwähnt ruft Butyrat die Induktion der 11 β -HSD-2 hervor und ist für die Formierung des Bürstensaums von Bedeutung. Weiterhin ist es an der Steigerung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase beteiligt, die als epithelialer Marker angesehen wird (Fukushima *et al.*, 1998; Pacha *et al.*, 2002). Die Butyrat-abhängige Induktion des MR in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen fügt sich in diese Reihe von Beobachtungen ein, da für die durch Butyrat induzierte 11 β -HSD-2 eine Kolokalisation mit dem MR in der Mukosa des Colons nachgewiesen wurde und die MR-Expression im Zuge der zellulären Differenzierung ansteigt (Schulman *et al.*, 1994).

Dieses Resultat legt weiterhin den Schluss nahe, dass die basale Expression des MR in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen zu gering ist, als dass die alleinige Expression mit Aldosteron die MR-abhängige Transaktivierung beispielsweise der ENaC-Untereinheiten β und γ in einem so relevanten Ausmaß induzieren könnte, das detektierbare Amilorid-sensitive Kurzschlussströme hervorruft. Diese Schwelle konnte durch den Zusatz von Butyrat über die Steigerung der MR-Expression überwunden werden. Dass in HT-29/B6-GR-Zellen die alleinige Inkubation mit Dexamethason hingegen zur Generierung signifikanter ENaC-vermittelter Na⁺-Transport-raten ausreichte (Zeissig *et al.*, 2006), kann somit entweder in einem stärkeren Expressionniveau des Rezeptors, in einer größeren

Transaktivierungseffizienz oder aber in vom GR bzw. MR differenziell vermittelten weiteren Effekten begründet liegen.

4. 2. 3 Zusammenspiel von Butyrat und Mineralocorticoiden beim ENaC-Targeting

Bei der näheren Klärung der Frage, ob allein die Expressionssteigerung von β - und γ -ENaC durch die kombinierte Inkubation mit Butyrat und Aldosteron ausschlaggebend für die Generierung des ausgeprägten Amilorid-sensitiven Kurzschlussstromes ist, hatte sich eine Korrelation zwischen eingesetzter Butyrat-Konzentration und steigender γ -ENaC-mRNA-Expression gezeigt. Da jedoch die parallele Messung des ENaC-vermittelten Na^+ -Transports ohne den Zusatz von Aldosteron trotz hoher ENaC-Expression keine detektierbaren Transportraten nachwies, lag der Schluss nahe, dass durch die Präsenz des Mineralocorticoids ein entscheidendes zweites Signal vermittelt wurde, das für die Lokalisation und Aktivität des ENaC in der apikalen Membran essentiell war.

Diese Ergebnisse stimmten mit früheren Studien zum ENaC-vermittelten Na^+ -Transport unter dem Einfluss von Butyrat überein, welche ergeben hatten, dass Butyrat die ENaC-Untereinheiten β und γ auf transkriptioneller Ebene induzierte, ein gesteigertes Niveau an ENaC in der apikalen Membran sowie ein signifikanter Amilorid-sensitiver Kurzschlussstrom aber nur bei gleichzeitiger Stimulation mit Corticosteroiden zustande kam (Zeissig *et al.*, 2007). Diese Beobachtung traf sowohl auf das distale Colon der Ratte als auch auf HT-29/B6-GR-Zellen zu.

Die Expression von Genen, für die eine Corticosteroid-abhängige Beteiligung an der Regulation des apikalen ENaC-Niveaus bekannt ist, wurde in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen per Real-time RT-PCR untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass ein Einfluss des kleinen G-Proteins K-Ras-2A unwahrscheinlich ist, da seine Expression weder unter Butyrat noch unter Aldosteron-Inkubation signifikanten Änderungen unterlag. Hingegen zeigte sich, dass *Serum- and Glucocorticoid-induced kinase-1* (SGK-1) einer schwachen Induktion durch Aldosteron unterlag, die durch die Präsenz von Butyrat stark intensiviert wurde. Allerdings ergab sich hier nach längeren Inkubationsperioden auch eine verstärkte Expression unter dem Einfluss von Butyrat allein. SGK-1 vermag das Niveau an apikal lokalisierten ENaC-Molekülen zu verstärken, indem es die ENaC-Ubiquitinligase Nedd4-2 phosphoryliert und dadurch ihre Interaktion mit dem ENaC hemmt (Debonneville *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2002). Es ist möglich, dass die gesteigerte Expression der SGK-1, die unter Butyrat und Aldosteron schon nach einer kürzeren Inkubationsdauer einsetzte als unter Butyrat allein, eine Rolle für die nur unter der Kostimulation mit Butyrat und Aldosteron beobachtete ENaC-

Transportaktivität spielt. Da aber auch nach langen Inkubationsperioden mit Butyrat und auch mit Butyratkonzentrationen, die über die Standarddosis von 2 mM hinausgingen, kein ENaC-vermittelter Na⁺-Transport messbar wurde, erscheint diese Möglichkeit als eher unwahrscheinlich. Denkbar ist auch, dass der Aktivierungsstatus der Kinase für das beschriebene Phänomen von Bedeutung ist. Es ist bekannt, dass die PIP₃-abhängigen Kinasen PDK-1 und -2 zur Aktivierung der SGK-1 mittels Phosphorylierung beitragen (Blazer-Yost *et al.*, 1999; Kobayashi & Cohen, 1999; Stockand, 2005; Wang *et al.*, 2001). Für K-Ras-2A, das über eine Aktivierung der PI3K die Bildung von PIP₃ hervorrufen kann, wurde zwar in diesem Zellsystem eine Rolle ausgeschlossen (Tong *et al.*, 2004), dennoch könnte aber ein anderer Aldosteron-abhängiger Mechanismus dazu beitragen, dass SGK-1 bei Anwesenheit von Butyrat stärker exprimiert wird und eine Aktivierung der Kinase der gleichzeitigen Präsenz von Aldosteron bedarf. Eine solche Hypothese könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Mithilfe von Western Blot-Analysen könnte der Aktivierungsstatus der Kinase über ihren Phosphorylierungsgrad an entscheidenden Aminosäureresten charakterisiert werden. Die dafür relevanten Aminosäuren sind die Reste Ser422 und Thr256. Die Aktivierung der SGK-1 wird durch eine PDK-2-vermittelte Phosphorylierung von Ser422 initiiert, auf die eine PDK-1-abhängige Phosphorylierung des Restes Thr256 folgt, die essentiell für die Aktivierung der SGK-1 ist (Kobayashi & Cohen, 1999; Park *et al.*, 1999).

Neben der Regulation der apikalen Lokalisation des ENaC können über SGK-1 auch Langzeiteffekte auf die Transkription des ENaC vermittelt werden. Es wurde gezeigt, dass die Kinase durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Af6 dessen zusammen mit Dot1a ausgeübte Inhibition der α-ENaC-Expression in Nierenzellen aufheben konnte (Zhang *et al.*, 2007). Ob ein ähnlicher Mechanismus auch für β- oder γ-ENaC in Colonzellen besteht, ist bislang ungeklärt und könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Die Analyse der Expression von GILZ (*Glucocorticoid-induced Leucin Zipper*) in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen zeigte eine schwache Induktion der Transkription unter Butyrat sowie unter Aldosteron allein. Allerdings konnte nach der simultanen Inkubation der Zellen mit Butyrat und Aldosteron eine synergistische Steigerung der mRNA-Expression von GILZ nachgewiesen werden, die ein Maximum nach einer Inkubationsdauer von 24 h erreichte. Somit stellte sich die GILZ-Induktion unter Butyrat/Aldosteron sowohl als stärker ausgeprägt als auch als länger anhaltend dar. Dieses Ergebnis konnte auch in *ex vivo*-Versuchen am distalen Colon der Ratte reproduziert werden. Das ~17 kDa große Leucin-Zipper-Protein ist ähnlich wie SGK-1 in der Lage, eine Anreicherung von ENaC-Molekülen in der apikalen Membran zu verursachen (Bhalla *et al.*, 2006). Dies geschieht jedoch über einen anderen Mechanismus, bei dem GILZ die ERK1/2-vermittelte Phosphorylierung der ENaC-Untereinheiten β und γ hemmt (Soundararajan *et al.*, 2007). Durch die fehlende

Phosphorylierung wird die Interaktion des ENaC mit Nedd4-2 inhibiert, so dass es zu einer Verringerung von Internalisierung und Degradation des ENaC kommt (Shi *et al.*, 2002).

Da im Falle von GILZ eine große Differenz zwischen dem durch Butyrat bzw. Aldosteron allein induzierten GILZ-Niveau und der Induktion durch Butyrat und Aldosteron in Kombination besteht, ist anzunehmen, dass die Steigerung der GILZ-Expression für die nur unter Butyrat und Aldosteron detektierbaren ENaC-vermittelten Na⁺-Transportraten von Bedeutung sein kann. Somit könnte hier das vermehrt vorhandene GILZ wie in der Literatur beschrieben durch seine Bindung an Ras und Raf zu einer Inhibition der ERK1/2-Aktivierung führen (Ayroldi *et al.*, 2007). Somit würde die ENaC-Phosphorylierung unterbunden werden, was eine Anreicherung der Kanäle in der apikalen Membran und eine Vergrößerung der Amilorid-sensitiven Kurzschlussströme nach sich zöge. Die Induktion von GILZ unter Butyrat/Aldosteron kann also das gesuchte erforderliche Ereignis darstellen, welches die apikale Lokalisation des ENaC verstärkt und für das die Präsenz von Aldosteron unerlässlich ist. Außerdem kann die verstärkte Expression des MR unter Butyrat daher nicht nur für die gesteigerte Transaktivierung der ENaC-Untereinheiten selbst, sondern auch für die Transaktivierung von GILZ ausschlaggebend sein.

Zukünftige Analysen zur Bedeutung von GILZ sollten daher zunächst eine Bestätigung der GILZ-Induktion auf Proteinebene beinhalten. Dies könnte per Western Blot-Analyse oder Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgen. Weiterhin könnte die Bedeutung von GILZ für den beobachteten Effekt von Butyrat und Aldosteron durch eine Inhibition seiner Expression mithilfe von RNAi (RNA-Interferenz) untermauert werden. Diese Methode ermöglicht durch den Einsatz kurzer doppelsträngiger RNA-Moleküle einen induzierten Abbau von komplementären mRNA-Molekülen in der Zelle. Durch ein mittels RNAi erreichbaren *Knockdown* von GILZ könnte untersucht werden, ob sich die Hemmung seiner Expressionssteigerung tatsächlich negativ auf die Generierung Amilorid-sensitiver Kurzschlussströme in HT-29/B6-Tet-On-MR-Zellen auswirkt.

Eine Induktion von GILZ im Colon war bislang nur durch Glucocorticoide nachgewiesen worden, während in der Niere sowohl eine Glucocorticoid- als auch eine Mineralocorticoid-induzierte Expression des Gens beobachtet worden war (Soundararajan *et al.*, 2005; van der Laan *et al.*, 2008). Daher stellt die im Rahmen dieser Arbeit gewonnene Erkenntnis der GILZ-Induktion die erste Beschreibung einer Mineralocorticoid-abhängigen GILZ-Expression in Colonepithelzellen dar.

Im Zusammenhang mit CED wurde GILZ bisher nur aufgrund seiner anti-inflammatorischen Eigenschaften beschrieben. Es wurde gezeigt, dass GILZ in lymphatischen Zellen (THP-1) nach Stimulation mit Glucocorticoiden die Funktion von NF-κB durch Interaktion mit der Untereinheit p65 inhibierte. Zusätzlich wurde die Produktion von pro-inflammatorischen Chemokinen und des TLR-2 gehemmt. Im Fall von Morbus Crohn konnte nachgewiesen

werden, dass in aktivierten Makrophagen die GILZ-Expression unterdrückt war (Berrebi *et al.*, 2003). Weiterhin wurde beobachtet, dass Mäuse, in deren T-Zellen GILZ unter der Kontrolle des CD2-Promotors überexprimiert wurde, weniger anfällig für die Induktion einer T_H^1 -Colitis durch DNBS waren als Wildtypmäuse (Cannarile *et al.*, 2009). Eine Bedeutung von GILZ bei CED ist demnach durch seine anti-inflammatorische Wirkung in lymphatischen Zellen gegeben, während die Rolle von GILZ in Epithelzellen bezogen auf die Dysregulation des ENaC-vermittelten Na^+ -Transports bei CED sowie die Glucocorticoid-Therapie dabei bislang ungeklärt blieb. Eine nähere Charakterisierung seiner Regulation sollte daher Gegenstand zukünftiger Studien sein. Zu diesem Zweck könnte nach Klonierung des GILZ-Promotors seine Regulation unter dem Einfluss von bei CED gesteigerten Zytokinen analysiert werden sowie die modulatorische Wirkung dieser Zytokine auf die GC- oder MC-abhängige Induktion von GILZ in An- oder Abwesenheit kurzkettiger Fettsäuren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Generierung der Zelllinie HT-29/B6-Tet-On-MR die Analyse der MR-abhängigen ENaC-Induktion in epithelialen Colonzellen ermöglichte. Dazu war die Stimulation mit Aldosteron im nanomolaren, also MR-spezifischen Konzentrationsbereich ausreichend. Die beobachteten resorptionssteigernden Effekte von Butyrat konnten auf eine Erhöhung des MR-Expressionsniveaus durch Butyrat zurückgeführt werden. Die gesteigerte Menge an MR-Protein rief in Abhängigkeit von Aldosteron eine verstärkte Transkription der ENaC-Untereinheiten β und γ selbst sowie von GILZ hervor, von dem sich eine essentielle Rolle beim Anstieg des Levels von ENaC-Molekülen in der apikalen Membran annehmen lässt.

Diese im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lassen sich abschließend in dem in Abbildung 4. 1 präsentierten Modell darstellen, das die Ergebnisse der beiden Projektteile der vorliegenden Promotionsarbeit zusammenführt.

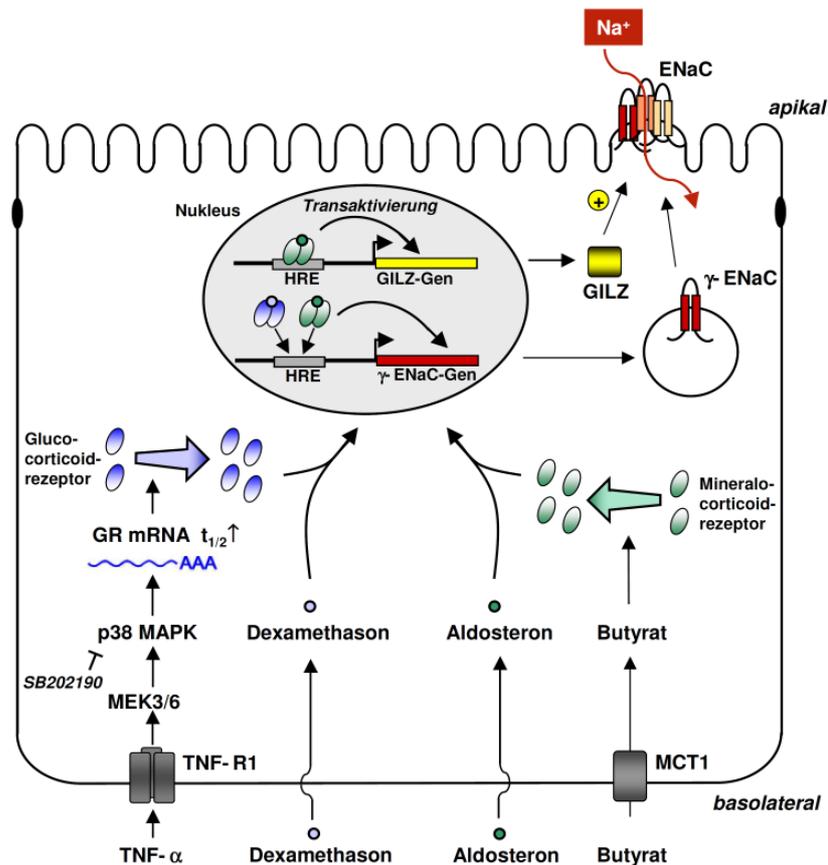


Abb. 4. 1: Modell zur Corticosteroid-abhängigen Induktion des ENaC-vermittelten Na^+ -Transports unter dem Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine und kurzkettiger Fettsäuren. TNF- α aktiviert - wahrscheinlich über den TNF-R1 (Schmitz *et al.*, 1999) - die MEK3/6 / p38 MAPK-Kaskade, wodurch eine Verlängerung der mRNA-Lebensdauer des GR bewirkt wird. Als Resultat wird das Gesamtniveau an GR-Protein gesteigert. Dexamethason aktiviert diese GR-Moleküle und nach Translokation in den Zellkern erfolgt die Bindung des GR an HREs, die in einiger Entfernung auf- oder abwärts vom proximalen Promoterbereich des γ -ENaC gelegen sind. Daraufhin wird die Transkription des γ -ENaC gesteigert und γ -ENaC-Untereinheiten werden synthetisiert.

Das durch bakterielle Fermentation im Colon freigesetzte Butyrat gelangt über den Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1) in die Zellen und steigert dort das Gesamtniveau des Mineralocorticoidrezeptors. Dieser wird durch seinen Liganden Aldosteron aktiviert und kann im Zellkern an bestimmte HREs binden. Dadurch wird einerseits die Expression des γ -ENaC selbst gesteigert, andererseits kommt es zu einer Induktion von GILZ, das dann über Hemmung der Ras/Raf/ERK1/2-Kaskade die Internalisierung bzw. Degradation des apikal lokalisierten ENaC schwächt.

So wurden die molekularen Mechanismen der Corticosteroid-abhängigen Induktion des ENaC-vermittelten Na^+ -Transports sowohl durch Glucocorticoide als auch durch Mineralocorticoide im Colon näher charakterisiert. Bei der Stimulation des Glucocorticoidrezeptors durch Dexamethason kam dabei eine synergistische Wirkung mit dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- α zum Tragen, welche durch die Steigerung des GR-Niveaus eine vermehrte Expression des ENaC vermittelte. Diese Erkenntnis lieferte eine Erklärung für die raschen, resorptionssteigernden Effekte der Glucocorticoidtherapie bei

CED. Bei der Induktion des ENaC durch das Mineralocorticoid Aldosteron via MR konnte beobachtet werden, dass eine Induktion von ENaC-vermitteltem Na^+ -Transport bei gleichzeitiger Präsenz der kurzkettigen Fettsäure Butyrat auftrat. Dabei war einerseits die verstärkte Expression des ENaC selbst essentiell, andererseits spielte die Induktion von an der Verminderung der ENaC-Degradation beteiligten Faktoren wie GILZ eine entscheidende Rolle. Die Aufklärung der genannten Mechanismen lieferte eine Begründung der resorptionssteigernden Wirkung von Butyrat, die zusätzlich zum bekannten anti-inflammatorischen Effekt den erfolgreichen therapeutischen Einsatz von Butyrat-Darmspülungen bei CED erklärt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der elektrogene Natriumtransport wird im distalen Colon durch den Epithelialen Natrium-Kanal (ENaC) kontrolliert. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) ist die Induktion des ENaC reduziert, wofür hauptsächlich die Hemmung der Transkription des ENaC durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α verantwortlich ist. Dies kann therapeutisch durch den Einsatz von Glucocorticoiden (GC) überwunden werden, die neben einer allgemeinen anti-inflammatorischen Wirkung auch einen schnellen Anstieg der Na⁺-Resorption zur Folge haben.

Während für die ENaC-Induktion durch Mineralocorticoide eine Antagonisierung durch TNF- α nachgewiesen werden konnte, wurde das Zusammenspiel von GC und TNF- α im Hinblick auf die ENaC-Regulation bisher noch nicht untersucht. Daher wurde im ersten Projektteil dieser Arbeit der Einfluss von TNF- α auf die ENaC-Induktion durch das synthetische Glucocorticoid Dexamethason im distalen Rattencolon und in der humanen Colon-Zelllinie HT-29/B6-GR charakterisiert. In beiden Systemen konnte nachgewiesen werden, dass Dexamethason nicht nur der TNF- α -vermittelten Inhibition des ENaC entgegenwirkte, sondern sogar eine synergistische Induktion des ENaC-abhängigen Na⁺-Transports verursachte. Dieser Synergismus resultierte aus einer durch TNF- α vermittelten Stabilisierung der mRNA des Glucocorticoidrezeptors (GR) und einer daraus folgenden Steigerung des GR-Proteinniveaus im Zusammenspiel mit der Aktivierung des GR durch Dexamethason. Parallel dazu wurde die Transkription der β - und γ -Untereinheit des ENaC gesteigert, wodurch es zu einer erhöhten ENaC-vermittelten Na⁺-Resorption kam. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass für den beobachteten Synergismus die MAP-Kinase p38 eine entscheidende Rolle spielt. Die Beobachtung eines synergistischen Effekts von TNF- α und Dexamethason bei der Induktion des ENaC-vermittelten Na⁺-Transports liefert eine Erklärung für die schnelle und ausgeprägte Resorptionssteigerung und anti-diarrhoische Wirkung von Glucocorticoiden bei der Behandlung von CED.

Neben Glucocorticoiden wird bei CED die kurzkettige Fettsäure Butyrat therapeutisch eingesetzt. Es wurde beobachtet, dass Butyrat ebenfalls eine transkriptionelle Expressionssteigerung des ENaC bewirkt. Für die Generierung signifikanter Na⁺-Transportraten via ENaC war die zusätzliche Anwesenheit von Corticosteroiden essentiell, jedoch blieben die zugrunde liegenden Mechanismen aufgrund des Mangels eines Mineralocorticoidrezeptor (MR)-exprimierenden Colonzellmodells bislang ungeklärt.

Im zweiten Projektteil dieser Arbeit wurde daher ein epitheliales Colonzellmodell generiert, das induzierbar den MR exprimiert (HT-29/B6-Tet-On-MR). In diesem Zellmodell ließen sich durch nanomolare Dosen des Mineralocorticoids Aldosteron funktionell aktive ENaC-Kanäle induzieren. Voraussetzung dafür war jedoch die gleichzeitige Präsenz von Butyrat, das eine verstärkte Expression des MR nach sich zog. Dies gewährleistete eine Aldosteron-

abhängige Stimulation der Expression von β - und γ -ENaC. Da Butyrat allein keinen signifikanten ENaC-vermittelten Na^+ -Transport auslöste, wurde bei der Suche nach weiteren Aldosteron-abhängigen Genen das Protein GILZ (*Glucocorticoid-induced Leucin Zipper*) als möglicher Faktor bei der Steigerung des ENaC-Niveaus in der apikalen Zellmembran identifiziert.

6 SUMMARY

The epithelial sodium channel (ENaC) mediates electrogenic sodium absorption in the distal large intestine. In patients with inflammatory bowel disease (IBD), ENaC induction is impaired, mainly via transcriptional suppression by pro-inflammatory cytokines like tumor necrosis factor (TNF)- α . This can be overcome by glucocorticoid therapy which promotes an anti-inflammatory effect as well as a rapid increase in sodium absorption.

While ENaC induction by mineralocorticoids has been shown to be antagonized by TNF- α , the interplay between glucocorticoids and TNF- α in ENaC regulation has remained elusive. Therefore, in the first part of this project, the influence of TNF- α on ENaC induction by the synthetic glucocorticoid dexamethasone has been characterized in rat distal colon and in the human colonic cell line HT-29/B6-GR. In both systems, dexamethasone not only preserved TNF- α -mediated ENaC suppression but caused synergistic induction of ENaC-dependent sodium absorption. This synergism was the result of a TNF- α -mediated stabilization of glucocorticoid receptor (GR)-mRNA leading to enhanced GR protein levels and a subsequent GR transactivation by dexamethasone. In parallel, transcription of the ENaC β and γ -subunits was up-regulated which increased ENaC-dependent sodium absorption. Furthermore, it was revealed that the activity of mitogen-activated protein kinase p38 was required for the observed synergy.

The synergistic increase in ENaC-mediated sodium transport via an enhanced expression of ENaC subunits β and γ dependent on TNF- α and dexamethasone explains the rapid and intense proabsorptive effect of glucocorticoid therapy in IBD.

Besides glucocorticoids the short-chain fatty acid butyrate is applied in the therapy of IBD. It was shown that butyrate also induces transcriptional up-regulation of ENaC. Still, for the generation of significant transport rates via ENaC the additional presence of corticosteroids was essential. The underlying mechanisms of this observation remained unknown due to the lack of a colonic cell line expressing functional mineralocorticoid receptor (MR).

In the second part of this project, an epithelial colonic cell model inducibly expressing the MR (HT-29/B6-Tet-On-MR) was generated. In this cell model, nanomolar doses of the mineralocorticoid aldosterone induced functional ENaC. The simultaneous presence of butyrate was a prerequisite for this induction, leading to high-level expression of the MR. This allowed for aldosterone-dependent up-regulation of β and γ -ENaC expression. As butyrate alone was not capable of promoting ENaC-mediated sodium transport, aldosterone-induced GILZ (*Glucocorticoid-induced Leucine Zipper*) was identified as a candidate factor increasing ENaC levels.

7 LITERATUR

Adcock, I. M. and Caramori, G. (2001). Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol* **79**, 376-84.

Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-56.

Almawi, W. Y. and Melemedjian, O. K. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol* **71**, 9-15.

Alvarez de la Rosa, D., Canessa, C. M., Fyfe, G. K. and Zhang, P. (2000). Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol* **62**, 573-94.

Amasheh, S., Barmeyer, C., Koch, C. S., Tavalali, S., Mankertz, J., Epple, H. J., Gehring, M. M., Florian, P., Kroesen, A. J., Zeitz, M. et al. (2004). Cytokine-dependent transcriptional down-regulation of epithelial sodium channel in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **126**, 1711-20.

Amin, M. R., Dudeja, P. K., Ramaswamy, K. and Malakooti, J. (2007). Involvement of Sp1 and Sp3 in differential regulation of human NHE3 promoter activity by sodium butyrate and IFN-gamma/TNF-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G374-82.

Anantharam, A. and Palmer, L. G. (2007). Determination of epithelial Na⁺ channel subunit stoichiometry from single-channel conductances. *J Gen Physiol* **130**, 55-70.

Asher, C., Wald, H., Rossier, B. C. and Garty, H. (1996). Aldosterone-induced increase in the abundance of Na⁺ channel subunits. *Am J Physiol* **271**, C605-11.

Auerbach, S. D., Loftus, R. W., Itani, O. A. and Thomas, C. P. (2000). Human amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel gamma subunit promoter: functional analysis and identification of a polypurine-polypyrimidine tract with the potential for triplex DNA formation. *Biochem J* **347 Pt 1**, 105-14.

Ayroldi, E., Zollo, O., Bastianelli, A., Marchetti, C., Agostini, M., Di Virgilio, R. and Riccardi, C. (2007). GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J Clin Invest* **117**, 1605-15.

- Barmeyer, C., Amasheh, S., Tavalali, S., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2004a). IL-1beta and TNFalpha regulate sodium absorption in rat distal colon. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 500-7.
- Barmeyer, C., Harren, M., Schmitz, H., Heinzl-Pleines, U., Mankertz, J., Seidler, U., Horak, I., Wiedenmann, B., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2004b). Mechanisms of diarrhea in the interleukin-2-deficient mouse model of colonic inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G244-52.
- Barmeyer, C., Horak, I., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2002). The interleukin-2-deficient mouse model. *Pathobiology* **70**, 139-42.
- Bazzoni, F., Rossato, M., Fabbri, M., Gaudiosi, D., Mirolo, M., Mori, L., Tamassia, N., Mantovani, A., Cassatella, M. A. and Locati, M.** (2009). Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 5282-7.
- Beattie, R. M., Croft, N. M., Fell, J. M., Afzal, N. A. and Heuschkel, R. B.** (2006). Inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child* **91**, 426-32.
- Beesley, A. H., Hornby, D. and White, S. J.** (1998). Regulation of distal nephron K⁺ channels (ROMK) mRNA expression by aldosterone in rat kidney. *J Physiol* **509 (Pt 3)**, 629-34.
- Beguin, P., Crambert, G., Guennoun, S., Garty, H., Horisberger, J. D. and Geering, K.** (2001). CHIF, a member of the FXFD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the gamma-subunit. *Embo J* **20**, 3993-4002.
- Bergann, T., Ploger, S., Fromm, A., Zeissig, S., Borden, S. A., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2009a). A colonic mineralocorticoid receptor cell model expressing epithelial Na⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun* **382**, 280-5.
- Bergann, T., Zeissig, S., Fromm, A., Richter, J. F., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2009b). Glucocorticoids and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce absorption by the epithelial sodium channel in the colon. *Gastroenterology* **136**, 933-42.
- Berrebi, D., Bruscoli, S., Cohen, N., Foussat, A., Migliorati, G., Bouchet-Delbos, L., Maillot, M. C., Portier, A., Couderc, J., Galanaud, P. et al.** (2003). Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* **101**, 729-38.

- Bhalla, V., Daidie, D., Li, H., Pao, A. C., LaGrange, L. P., Wang, J., Vandewalle, A., Stockand, J. D., Staub, O. and Pearce, D.** (2005). 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* **19**, 3073-84.
- Bhalla, V. and Hallows, K. R.** (2008). Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *J Am Soc Nephrol* **19**, 1845-54.
- Bhalla, V., Soundararajan, R., Pao, A. C., Li, H. and Pearce, D.** (2006). Disinhibitory pathways for control of sodium transport: regulation of ENaC by SGK1 and GILZ. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**, F714-21.
- Biola, A., Andreau, K., David, M., Sturm, M., Haake, M., Bertoglio, J. and Pallardy, M.** (2000). The glucocorticoid receptor and STAT6 physically and functionally interact in T-lymphocytes. *FEBS Lett* **487**, 229-33.
- Blazer-Yost, B. L., Paunescu, T. G., Helman, S. I., Lee, K. D. and Vlahos, C. J.** (1999). Phosphoinositide 3-kinase is required for aldosterone-regulated sodium reabsorption. *Am J Physiol* **277**, C531-6.
- Blind, R. D. and Garabedian, M. J.** (2008). Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* **109**, 150-7.
- Brennan, F. E. and Fuller, P. J.** (2000). Rapid upregulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo. *Mol Cell Endocrinol* **166**, 129-36.
- Brennan, F. E. and Fuller, P. J.** (2006). Mammalian K-ras2 is a corticosteroid-induced gene in vivo. *Endocrinology* **147**, 2809-16.
- Briata, P., Forcales, S. V., Ponassi, M., Corte, G., Chen, C. Y., Karin, M., Puri, P. L. and Gherzi, R.** (2005). p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol Cell* **20**, 891-903.
- Bruno, M. E. and Kaetzel, C. S.** (2005). Long-term exposure of the HT-29 human intestinal epithelial cell line to TNF causes sustained up-regulation of the polymeric Ig receptor and proinflammatory genes through transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Immunol* **174**, 7278-84.

-
- Büning, C. and Lochs, H.** (2006). Conventional therapy for Crohn's disease. *World J Gastroenterol* **12**, 4794-806.
- Bürgel, N., Bojarski, C., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2002). Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* **123**, 433-43.
- Butterworth, M. B., Edinger, R. S., Frizzell, R. A. and Johnson, J. P.** (2009). Regulation of the epithelial sodium channel by membrane trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F10-24.
- Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D. and Rossier, B. C.** (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* **367**, 463-7.
- Cannarile, L., Cuzzocrea, S., Santucci, L., Agostini, M., Mazzon, E., Esposito, E., Muia, C., Coppo, M., Di Paola, R. and Riccardi, C.** (2009). Glucocorticoid-induced leucine zipper is protective in Th1-mediated models of colitis. *Gastroenterology* **136**, 530-41.
- Chalfie, M. and Wolinsky, E.** (1990). The identification and suppression of inherited neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **345**, 410-6.
- Chang, S. S., Grunder, S., Hanukoglu, A., Rosler, A., Mathew, P. M., Hanukoglu, I., Schild, L., Lu, Y., Shimkets, R. A., Nelson-Williams, C. et al.** (1996). Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat Genet* **12**, 248-53.
- Charney, A. N., Kinsey, M. D., Myers, L., Gainella, R. A. and Gots, R. E.** (1975). Na⁺-K⁺-activated adenosine triphosphatase and intestinal electrolyte transport. Effect of adrenal steroids. *J Clin Invest* **56**, 653-60.
- Chida, D., Wakao, H., Yoshimura, A. and Miyajima, A.** (1998). Transcriptional regulation of the beta-casein gene by cytokines: cross-talk between STAT5 and other signaling molecules. *Mol Endocrinol* **12**, 1792-806.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- Chrousos, G. P. and Kino, T.** (2005). Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE* **2005**, pe48.

- Cuff, M. A., Lambert, D. W. and Shirazi-Beechey, S. P.** (2002). Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol* **539**, 361-71.
- Cuff, M. A. and Shirazi-Beechey, S. P.** (2004). The importance of butyrate transport to the regulation of gene expression in the colonic epithelium. *Biochem Soc Trans* **32**, 1100-2.
- Currid, A., Ortega, B. and Valverde, M. A.** (2004). Chloride secretion in a morphologically differentiated human colonic cell line that expresses the epithelial Na⁺ channel. *J Physiol* **555**, 241-50.
- D'Adamio, F., Zollo, O., Moraca, R., Ayroldi, E., Bruscoli, S., Bartoli, A., Cannarile, L., Migliorati, G. and Riccardi, C.** (1997). A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* **7**, 803-12.
- de Kloet, E. R., Fitzsimons, C. P., Datson, N. A., Meijer, O. C. and Vreugdenhil, E.** (2009). Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: About receptors, transcription machinery and microRNA. *Brain Res.*
- Debonneville, C., Flores, S. Y., Kamynina, E., Plant, P. J., Tauxe, C., Thomas, M. A., Munster, C., Chraibi, A., Pratt, J. H., Horisberger, J. D. et al.** (2001). Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na⁽⁺⁾ channel cell surface expression. *Embo J* **20**, 7052-9.
- Di Fabio, F., Alvarado, C., Majdan, A., Gologan, A., Voda, L., Mitmaker, E., Beitel, L. K., Gordon, P. H. and Trifiro, M.** (2007). Underexpression of mineralocorticoid receptor in colorectal carcinomas and association with VEGFR-2 overexpression. *J Gastrointest Surg* **11**, 1521-8.
- Dong, Y., Aronsson, M., Gustafsson, J. A. and Okret, S.** (1989). The mechanism of cAMP-induced glucocorticoid receptor expression. Correlation to cellular glucocorticoid response. *J Biol Chem* **264**, 13679-83.
- Donnert, G., Keller, J., Medda, R., Andrei, M. A., Rizzoli, S. O., Luhrmann, R., Jahn, R., Eggeling, C. and Hell, S. W.** (2006). Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11440-5.
- Duma, D., Jewell, C. M. and Cidlowski, J. A.** (2006). Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**, 11-21.

- Ehltig, C., Lai, W. S., Schaper, F., Brenndorfer, E. D., Matthes, R. J., Heinrich, P. C., Ludwig, S., Blackshear, P. J., Gaestel, M., Haussinger, D. et al.** (2007). Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *J Immunol* **178**, 2813-26.
- Epple, H. J., Amasheh, S., Mankertz, J., Goltz, M., Schulzke, J. D. and Fromm, M.** (2000). Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G718-24.
- Fakitsas, P., Adam, G., Daidie, D., van Bemmelen, M. X., Fouladkou, F., Patrignani, A., Wagner, U., Warth, R., Camargo, S. M., Staub, O. et al.** (2007). Early aldosterone-induced gene product regulates the epithelial sodium channel by deubiquitylation. *J Am Soc Nephrol* **18**, 1084-92.
- Faller, L. D.** (2008). Mechanistic studies of sodium pump. *Arch Biochem Biophys* **476**, 12-21.
- Firsov, D., Gautschi, I., Merillat, A. M., Rossier, B. C. and Schild, L.** (1998). The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *Embo J* **17**, 344-52.
- Firsov, D., Schild, L., Gautschi, I., Merillat, A. M., Schneeberger, E. and Rossier, B. C.** (1996). Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15370-5.
- Fromm, M. and Hegel, U.** (1987). Net ion fluxes and zero flux limiting concentrations in rat upper colon and rectum during anaesthesia-induced aldosterone liberation. *Pflugers Arch* **408**, 185-93.
- Fromm, M., Schulzke, J. D. and Hegel, U.** (1993). Control of electrogenic Na⁺ absorption in rat late distal colon by nanomolar aldosterone added in vitro. *Am J Physiol* **264**, E68-73.
- Fukushima, K., Sasaki, I., Hasegawa, H., Takahashi, K., Naito, H., Funayama, Y. and Matsuno, S.** (1998). Sodium butyrate-induced liver-type alkaline phosphatase activity in a small intestinal epithelial cell line, IEC6. *Dig Dis Sci* **43**, 1116-23.
- Fukushima, K., Sasaki, I., Sato, S., Sasano, H., Krozowski, Z. and Matsuno, S.** (1999). Induction of mineralocorticoid receptor by sodium butyrate in small intestinal (IEC6) and colonic (T84) epithelial cell lines. *Dig Dis Sci* **44**, 1571-8.
- Funder, J. W.** (2005). Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. *Heart Fail Rev* **10**, 15-22.

Gaeggeler, H. P., Gonzalez-Rodriguez, E., Jaeger, N. F., Loffing-Cueni, D., Norregaard, R., Loffing, J., Horisberger, J. D. and Rossier, B. C. (2005). Mineralocorticoid versus glucocorticoid receptor occupancy mediating aldosterone-stimulated sodium transport in a novel renal cell line. *J Am Soc Nephrol* **16**, 878-91.

Garneau, N. L., Wilusz, J. and Wilusz, C. J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 113-26.

Gitter, A. H., Bendfeldt, K., Schmitz, H., Schulzke, J. D., Bentzel, C. J. and Fromm, M. (2000). Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor- α . *Ann N Y Acad Sci* **915**, 193-203.

Gomez-Sanchez, C. E., de Rodriguez, A. F., Romero, D. G., Estess, J., Warden, M. P., Gomez-Sanchez, M. T. and Gomez-Sanchez, E. P. (2006). Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* **147**, 1343-8.

Goulet, C. C., Volk, K. A., Adams, C. M., Prince, L. S., Stokes, J. B. and Snyder, P. M. (1998). Inhibition of the epithelial Na⁺ channel by interaction of Nedd4 with a PY motif deleted in Liddle's syndrome. *J Biol Chem* **273**, 30012-7.

Greig, E. and Sandle, G. I. (2000). Diarrhea in ulcerative colitis. The role of altered colonic sodium transport. *Ann N Y Acad Sci* **915**, 327-32.

Greig, E. R., Boot-Handford, R. P., Mani, V. and Sandle, G. I. (2004). Decreased expression of apical Na⁺ channels and basolateral Na⁺, K⁺-ATPase in ulcerative colitis. *J Pathol* **204**, 84-92.

Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F. J. and Brummer, R. J. (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* **27**, 104-19.

Harrison, R. J., McNeil, G. P. and Dobner, P. R. (1995). Synergistic activation of neurotensin/neuromedin N gene expression by c-Jun and glucocorticoids: novel effects of Fos family proteins. *Mol Endocrinol* **9**, 981-93.

Hawker, P. C., McKay, J. S. and Turnberg, L. A. (1980). Electrolyte transport across colonic mucosa from patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **79**, 508-11.

- Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. and Cato, A. C.** (1994). A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *Embo J* **13**, 4087-95.
- Hegel, U. and Fromm, M.** (1990). Electrical measurements in large intestine (including caecum, colon, rectum). *Methods Enzymol* **192**, 459-84.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A. H., Bürgel, N., Fromm, M. et al.** (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* **129**, 550-64.
- Heller, F., Fromm, A., Gitter, A. H., Mankertz, J. and Schulzke, J. D.** (2008). Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol* **1 Suppl 1**, S58-61.
- Hermoso, M. A., Matsuguchi, T., Smoak, K. and Cidlowski, J. A.** (2004). Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression. *Mol Cell Biol* **24**, 4743-56.
- Hierholzer, K. and Fromm, M.** (1997). Wasser- und Elektrolythaushalt. In *Physiologie des Menschen*, R. F. Schmidt und G. Thews, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 27. Auflage, Kapitel 36
- Inan, M. S., Rasoulpour, R. J., Yin, L., Hubbard, A. K., Rosenberg, D. W. and Giardina, C.** (2000). The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* **118**, 724-34.
- Ioannidis, P., Mahaira, L., Papadopoulou, A., Teixeira, M. R., Heim, S., Andersen, J. A., Evangelou, E., Dafni, U., Pandis, N. and Trangas, T.** (2003). CRD-BP: a c-Myc mRNA stabilizing protein with an oncofetal pattern of expression. *Anticancer Res* **23**, 2179-83.
- Itoh, M., Adachi, M., Yasui, H., Takekawa, M., Tanaka, H. and Imai, K.** (2002). Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol Endocrinol* **16**, 2382-92.
- Jacobsen, B. A., Fallingborg, J., Rasmussen, H. H., Nielsen, K. R., Drewes, A. M., Puho, E., Nielsen, G. L. and Sorensen, H. T.** (2006). Increase in incidence and prevalence of

inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **18**, 601-6.

Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E. B. and Gouaux, E. (2007). Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* **449**, 316-23.

Kalinyak, J. E., Bradshaw, J. G. and Perlman, A. J. (1992). The role of development and adrenal steroids in the regulation of the mineralocorticoid receptor messenger RNA. *Horm Metab Res* **24**, 106-9.

Kellenberger, S. and Schild, L. (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* **82**, 735-67.

Kiela, P. R., Xu, H. and Ghishan, F. K. (2006). Apical Na^+/H^+ exchangers in the mammalian gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* **57 Suppl 7**, 51-79.

Kobayashi, T. and Cohen, P. (1999). Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J* **339 (Pt 2)**, 319-28.

Kolla, V. and Litwack, G. (2000a). Inhibition of mineralocorticoid-mediated transcription by NF- κ B. *Arch Biochem Biophys* **383**, 38-45.

Kolla, V. and Litwack, G. (2000b). Transcriptional regulation of the human Na/K ATPase via the human mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Biochem* **204**, 35-40.

Komatsu, M., Kobayashi, D., Saito, K., Furuya, D., Yagihashi, A., Araake, H., Tsuji, N., Sakamaki, S., Niitsu, Y. and Watanabe, N. (2001). Tumor necrosis factor- α in serum of patients with inflammatory bowel disease as measured by a highly sensitive immuno-PCR. *Clin Chem* **47**, 1297-301.

Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F. and Kollias, G. (1999). Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* **10**, 387-98.

Kosari, F., Sheng, S., Li, J., Mak, D. O., Foskett, J. K. and Kleyman, T. R. (1998). Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* **273**, 13469-74.

- Kreusel, K. M., Fromm, M., Schulzke, J. D. and Hegel, U.** (1991). Cl- secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol* **261**, C574-82.
- Krstic, M. D., Rogatsky, I., Yamamoto, K. R. and Garabedian, M. J.** (1997). Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* **17**, 3947-54.
- Kühn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. and Muller, W.** (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263-74.
- Kunzelmann, K. and Mall, M.** (2002). Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* **82**, 245-89.
- Kyriakis, J. M. and Avruch, J.** (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**, 807-69.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Le Drean, Y., Mincheneau, N., Le Goff, P. and Michel, D.** (2002). Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology* **143**, 3482-9.
- Lerner, L., Henriksen, M. A., Zhang, X. and Darnell, J. E., Jr.** (2003). STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha 2-macroglobulin gene. *Genes Dev* **17**, 2564-77.
- Li, H., Sheppard, D. N. and Hug, M. J.** (2004). Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cyst Fibros* **3 Suppl 2**, 123-6.
- Liddle, G. W., Bledsoe, T. and Coppage, W. S.** (1963). A familial renal disorder simulating aldosteronism but with negligible aldosterone secretion. *Trans Am Assoc Phys* **76**, 199-213.
- Liu, Q. S., Nilsen-Hamilton, M. and Xiong, S. D.** (2003). Synergistic regulation of the acute phase protein SIP24/24p3 by glucocorticoid and pro-inflammatory cytokines. *Sheng Li Xue Bao* **55**, 525-9.
- Lombes, M., Claire, M., Pinto, M., Michaud, A. and Rafestin-Oblin, M. E.** (1984). Aldosterone binding in the human colon carcinoma cell line HT29: correlation with cell differentiation. *J Steroid Biochem* **20**, 329-33.

- Lombes, M., Farman, N., Oblin, M. E., Baulieu, E. E., Bonvalet, J. P., Erlanger, B. F. and Gasc, J. M.** (1990). Immunohistochemical localization of renal mineralocorticoid receptor by using an anti-idiotypic antibody that is an internal image of aldosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1086-8.
- Lu, N. Z. and Cidlowski, J. A.** (2006). Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* **16**, 301-7.
- Lührs, H., Gerke, T., Muller, J. G., Melcher, R., Schaubert, J., Boxberge, F., Scheppach, W. and Menzel, T.** (2002). Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* **37**, 458-66.
- Mankertz, J., Amasheh, M., Krug, S. M., Fromm, A., Amasheh, S., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Fromm, M. and Schulzke, J. D.** (2009). TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res.*
- Martinez-Augustin, O., Romero-Calvo, I., Suarez, M. D., Zarzuelo, A. and de Medina, F. S.** (2009). Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* **15**, 114-27.
- Masilamani, S., Kim, G. H., Mitchell, C., Wade, J. B. and Knepper, M. A.** (1999). Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* **104**, R19-23.
- Matsukawa, A.** (2007). STAT proteins in innate immunity during sepsis: lessons from gene knockout mice. *Acta Med Okayama* **61**, 239-45.
- Mazzon, E. and Cuzzocrea, S.** (2008). Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G1268-80.
- McKay, L. I. and Cidlowski, J. A.** (1998). Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol* **12**, 45-56.
- Meneely, R. and Ghishan, F. K.** (1982). Intestinal maturation in the rat: the effect of glucocorticoids on sodium, potassium, water and glucose absorption. *Pediatr Res* **16**, 776-8.
- Mick, V. E., Itani, O. A., Loftus, R. W., Husted, R. F., Schmidt, T. J. and Thomas, C. P.** (2001). The alpha-subunit of the epithelial sodium channel is an aldosterone-induced

transcript in mammalian collecting ducts, and this transcriptional response is mediated via distinct cis-elements in the 5'-flanking region of the gene. *Mol Endocrinol* **15**, 575-88.

Miller, A. L., Webb, M. S., Copik, A. J., Wang, Y., Johnson, B. H., Kumar, R. and Thompson, E. B. (2005). p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol* **19**, 1569-83.

Moriggl, R., Berchtold, S., Friedrich, K., Standke, G. J., Kammer, W., Heim, M., Wissler, M., Stocklin, E., Gouilleux, F. and Groner, B. (1997). Comparison of the transactivation domains of Stat5 and Stat6 in lymphoid cells and mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* **17**, 3663-78.

Naray-Fejes-Toth, A., Snyder, P. M. and Fejes-Toth, G. (2004). The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone and stimulates epithelial sodium channel-mediated Na⁺ transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17434-9.

Noskov, S. Y., Berneche, S. and Roux, B. (2004). Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature* **431**, 830-4.

Oakley, R. H., Jewell, C. M., Yudt, M. R., Bofetiado, D. M. and Cidlowski, J. A. (1999). The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* **274**, 27857-66.

Odermatt, A. and Atanasov, A. G. (2009). Mineralocorticoid receptors: emerging complexity and functional diversity. *Steroids* **74**, 163-71.

Owczarek, D., Cibor, D., Szczepanek, M. and Mach, T. (2009). Biological therapy of inflammatory bowel disease. *Pol Arch Med Wewn* **119**, 84-8.

Pacha, J., Lisa, V. and Miksik, I. (2002). Effect of cellular differentiation on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the intestine. *Steroids* **67**, 119-26.

Papadakis, K. A. and Targan, S. R. (2000). Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* **51**, 289-98.

Park, J., Leong, M. L., Buse, P., Maiyar, A. C., Firestone, G. L. and Hemmings, B. A. (1999). Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *Embo J* **18**, 3024-33.

- Pearce, D. and Yamamoto, K. R.** (1993). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science* **259**, 1161-5.
- Pippal, J. B. and Fuller, P. J.** (2008). Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol* **41**, 405-13.
- Price, M., Probert, C. S. and Creed, T.** (2008). Basiliximab and infliximab for the treatment of steroid-refractory Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **103**, 2665.
- Renard, S., Voilley, N., Bassilana, F., Lazdunski, M. and Barbry, P.** (1995). Localization and regulation by steroids of the alpha, beta and gamma subunits of the amiloride-sensitive Na⁺ channel in colon, lung and kidney. *Pflugers Arch* **430**, 299-307.
- Rogatsky, I. and Ivashkiv, L. B.** (2006). Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens* **68**, 1-12.
- Rogatsky, I., Logan, S. K. and Garabedian, M. J.** (1998a). Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2050-5.
- Rogatsky, I., Waase, C. L. and Garabedian, M. J.** (1998b). Phosphorylation and inhibition of rat glucocorticoid receptor transcriptional activation by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Species-specific differences between human and rat glucocorticoid receptor signaling as revealed through GSK-3 phosphorylation. *J Biol Chem* **273**, 14315-21.
- Ross, J.** (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* **59**, 423-50.
- Roux, P. P. and Blenis, J.** (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320-44.
- Rozen, S. and Skaletzky, H. J.** (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Totowa, NJ: Humana Press.
- Rutgeerts, P., Sandborn, W. J., Feagan, B. G., Reinisch, W., Olson, A., Johanns, J., Travers, S., Rachmilewitz, D., Hanauer, S. B., Lichtenstein, G. R. et al.** (2005). Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* **353**, 2462-76.
- Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A. C. and Horak, I.** (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* **75**, 253-61.

- Sandle, G. I.** (1991). Segmental variability of glucocorticoid induced electrolyte transport in rat colon. *Gut* **32**, 936-40.
- Sandle, G. I., Hayslett, J. P. and Binder, H. J.** (1986). Effect of glucocorticoids on rectal transport in normal subjects and patients with ulcerative colitis. *Gut* **27**, 309-16.
- Sandle, G. I., Higgs, N., Crowe, P., Marsh, M. N., Venkatesan, S. and Peters, T. J.** (1990). Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon. *Gastroenterology* **99**, 97-105.
- Sandler, H. and Stoecklin, G.** (2008). Control of mRNA decay by phosphorylation of tristetraprolin. *Biochem Soc Trans* **36**, 491-6.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Schäcke, H., Berger, M., Rehwinkel, H. and Asadullah, K.** (2007). Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. *Mol Cell Endocrinol* **275**, 109-17.
- Scheppach, W., Sommer, H., Kirchner, T., Paganelli, G. M., Bartram, P., Christl, S., Richter, F., Dusel, G. and Kasper, H.** (1992). Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* **103**, 51-6.
- Scheppach, W. and Weiler, F.** (2004). The butyrate story: old wine in new bottles? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **7**, 563-7.
- Schild, L., Lu, Y., Gautschi, I., Schneeberger, E., Lifton, R. P. and Rossier, B. C.** (1996). 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* **15**, 2381-7.
- Schmitz, H., Fromm, M., Bentzel, C. J., Scholz, P., Detjen, K., Mankertz, J., Bode, H., Epple, H. J., Riecken, E. O. and Schulzke, J. D.** (1999). Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* **112** (Pt 1), 137-46.
- Schoneveld, O. J., Gaemers, I. C. and Lamers, W. H.** (2004). Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta* **1680**, 114-28.

- Schuetz, J. D., Schuetz, E. G., Thottassery, J. V., Guzelian, P. S., Strom, S. and Sun, D.** (1996). Identification of a novel dexamethasone responsive enhancer in the human CYP3A5 gene and its activation in human and rat liver cells. *Mol Pharmacol* **49**, 63-72.
- Schug, J., Overton, G.C.** (1997). TESS:Transcription Element Search Software. (<http://www.cbil.upenn.edu/tess/techreports/1997/CBIL-TR-1997-1001-v0.0.pdf>)
Computational and Informatics Laboratory, School of Medicine, University of Pennsylvania.
- Schulman, G., Robertson, N. M., Elfenbein, I. B., Eneanya, D., Litwack, G. and Bastl, C. P.** (1994). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor steroid binding and localization in colonic cells. *Am J Physiol* **266**, C729-40.
- Schultheis, P. J., Clarke, L. L., Meneton, P., Miller, M. L., Soleimani, M., Gawenis, L. R., Riddle, T. M., Duffy, J. J., Doetschman, T., Wang, T. et al.** (1998). Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet* **19**, 282-5.
- Segain, J. P., Raingeard de la Bletiere, D., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottiere, H. M. and Galmiche, J. P.** (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* **47**, 397-403.
- Shaul, Y. D. and Seger, R.** (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1213-26.
- Shaw, G. and Kamen, R.** (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**, 659-67.
- Shi, H., Asher, C., Chigaev, A., Yung, Y., Reuveny, E., Seger, R. and Garty, H.** (2002). Interactions of beta and gamma ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **277**, 13539-47.
- Shigaev, A., Asher, C., Latter, H., Garty, H. and Reuveny, E.** (2000). Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na⁽⁺⁾ channel. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F613-9.
- Smoak, K. A. and Cidlowski, J. A.** (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* **125**, 697-706.
- Snyder, P. M.** (2002). The epithelial Na⁺ channel: cell surface insertion and retrieval in Na⁺ homeostasis and hypertension. *Endocr Rev* **23**, 258-75.

- Snyder, P. M., Cheng, C., Prince, L. S., Rogers, J. C. and Welsh, M. J.** (1998). Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits. *J Biol Chem* **273**, 681-4.
- Snyder, P. M., Olson, D. R. and Thomas, B. C.** (2002). Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem* **277**, 5-8.
- Sorensen, M. V., Matos, J. E., Sausbier, M., Sausbier, U., Ruth, P., Praetorius, H. A. and Leipziger, J.** (2008). Aldosterone increases KCa1.1 (BK) channel-mediated colonic K⁺ secretion. *J Physiol* **586**, 4251-64.
- Soundararajan, R., Wang, J., Melters, D. and Pearce, D.** (2007). Differential activities of glucocorticoid-induced leucine zipper protein isoforms. *J Biol Chem* **282**, 36303-13.
- Soundararajan, R., Zhang, T. T., Wang, J., Vandewalle, A. and Pearce, D.** (2005). A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *J Biol Chem* **280**, 39970-81.
- Sparanese, D. and Lee, C. H.** (2007). CRD-BP shields c-myc and MDR-1 RNA from endonucleolytic attack by a mammalian endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* **35**, 1209-21.
- Stallmach, A., Giese, T., Schmidt, C., Ludwig, B., Mueller-Molaian, I. and Meuer, S. C.** (2004). Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* **19**, 308-15.
- Staruschenko, A., Patel, P., Tong, Q., Medina, J. L. and Stockand, J. D.** (2004). Ras activates the epithelial Na⁽⁺⁾ channel through phosphoinositide 3-OH kinase signaling. *J Biol Chem* **279**, 37771-8.
- Staruschenko, A., Pochynyuk, O. M., Tong, Q. and Stockand, J. D.** (2005). Ras couples phosphoinositide 3-OH kinase to the epithelial Na⁺ channel. *Biochim Biophys Acta* **1669**, 108-15.
- Staub, O., Dho, S., Henry, P., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J. and Rotin, D.** (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *Embo J* **15**, 2371-80.

- Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L. and Rotin, D.** (1997). Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination. *Embo J* **16**, 6325-36.
- Stockand, J. D.** (2002). New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F559-76.
- Stockand, J. D.** (2005). Preserving salt: in vivo studies with Sgk1-deficient mice define a modern role for this ancient protein. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R1-3.
- Stockand, J. D., Spier, B. J., Worrell, R. T., Yue, G., Al-Baldawi, N. and Eaton, D. C.** (1999). Regulation of Na(+) reabsorption by the aldosterone-induced small G protein K-Ras2A. *J Biol Chem* **274**, 35449-54.
- Strautnieks, S. S., Thompson, R. J., Gardiner, R. M. and Chung, E.** (1996). A novel splice-site mutation in the gamma subunit of the epithelial sodium channel gene in three pseudohypoaldosteronism type 1 families. *Nat Genet* **13**, 248-50.
- Szatmary, Z., Garabedian, M. J. and Vilcek, J.** (2004). Inhibition of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional activation by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase. *J Biol Chem* **279**, 43708-15.
- Targan, S. R., Hanauer, S. B., van Deventer, S. J., Mayer, L., Present, D. H., Braakman, T., DeWoody, K. L., Schaible, T. F. and Rutgeerts, P. J.** (1997). A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* **337**, 1029-35.
- Teiwes, J. and Toto, R. D.** (2007). Epithelial sodium channel inhibition in cardiovascular disease. A potential role for amiloride. *Am J Hypertens* **20**, 109-17.
- Thomas, C. P., Doggett, N. A., Fisher, R. and Stokes, J. B.** (1996). Genomic organization and the 5' flanking region of the gamma subunit of the human amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *J Biol Chem* **271**, 26062-6.
- Thomas, C. P., Loftus, R. W., Liu, K. Z. and Itani, O. A.** (2002). Genomic organization of the 5' end of human beta-ENaC and preliminary characterization of its promoter. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F898-909.

- Thorn, C. F., Lu, Z. Y. and Whitehead, A. S.** (2003). Tissue-specific regulation of the human acute-phase serum amyloid A genes, SAA1 and SAA2, by glucocorticoids in hepatic and epithelial cells. *Eur J Immunol* **33**, 2630-9.
- Tian, S., Poukka, H., Palvimo, J. J. and Janne, O. A.** (2002). Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem J* **367**, 907-11.
- Tong, Q., Booth, R. E., Worrell, R. T. and Stockand, J. D.** (2004). Regulation of Na⁺ transport by aldosterone: signaling convergence and cross talk between the PI3-K and MAPK1/2 cascades. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F1232-8.
- Trujillo, M. E., Lee, M. J., Sullivan, S., Feng, J., Schneider, S. H., Greenberg, A. S. and Fried, S. K.** (2006). Tumor necrosis factor alpha and glucocorticoid synergistically increase leptin production in human adipose tissue: role for p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 1484-90.
- Tudor, C., Marchese, F. P., Hitti, E., Aubareda, A., Rawlinson, L., Gaestel, M., Blackshear, P. J., Clark, A. R., Saklatvala, J. and Dean, J. L.** (2009). The p38 MAPK pathway inhibits tristetraprolin-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages. *FEBS Lett* **583**, 1933-8.
- Uchida, S., Nishida, A., Hara, K., Kamemoto, T., Suetsugi, M., Fujimoto, M., Watanuki, T., Wakabayashi, Y., Otsuki, K., McEwen, B. S. et al.** (2008). Characterization of the vulnerability to repeated stress in Fischer 344 rats: possible involvement of microRNA-mediated down-regulation of the glucocorticoid receptor. *Eur J Neurosci* **27**, 2250-61.
- Ukil, A., Maity, S. and Das, P. K.** (2006). Protection from experimental colitis by theaflavin-3,3'-digallate correlates with inhibition of IKK and NF-kappaB activation. *Br J Pharmacol* **149**, 121-31.
- Ussing, H. H. and Zerahn, K.** (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* **23**, 110-27.
- van der Laan, S., Sarabdjitsingh, R. A., Van Batenburg, M. F., Lachize, S. B., Li, H., Dijkmans, T. F., Vreugdenhil, E., de Kloet, E. R. and Meijer, O. C.** (2008). Chromatin immunoprecipitation scanning identifies glucocorticoid receptor binding regions in the proximal promoter of a ubiquitously expressed glucocorticoid target gene in brain. *J Neurochem* **106**, 2515-23.

- Verrey, F.** (1999). Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Physiol* **277**, F319-27.
- Vidyasagar, S. and Ramakrishna, B. S.** (2002). Effects of butyrate on active sodium and chloride transport in rat and rabbit distal colon. *J Physiol* **539**, 163-73.
- Viengchareun, S., Le Menuet, D., Martinerie, L., Munier, M., Pascual-Le Tallec, L. and Lombes, M.** (2007). The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* **5**, e012.
- Voilley, N., Bassilana, F., Mignon, C., Merscher, S., Mattei, M. G., Carle, G. F., Lazdunski, M. and Barbry, P.** (1995). Cloning, chromosomal localization, and physical linkage of the beta and gamma subunits (SCNN1B and SCNN1G) of the human epithelial amiloride-sensitive sodium channel. *Genomics* **28**, 560-5.
- Vreugdenhil, E., Verissimo, C. S., Mariman, R., Kamphorst, J. T., Barbosa, J. S., Zweers, T., Champagne, D. L., Schouten, T., Meijer, O. C., de Kloet, E. R. et al.** (2009). MicroRNA 18 and 124a down-regulate the glucocorticoid receptor: implications for glucocorticoid responsiveness in the brain. *Endocrinology* **150**, 2220-8.
- Wallace, A. D. and Cidlowski, J. A.** (2001). Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* **276**, 42714-21.
- Wang, F., Schwarz, B. T., Graham, W. V., Wang, Y., Su, L., Clayburgh, D. R., Abraham, C. and Turner, J. R.** (2006a). IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. *Gastroenterology* **131**, 1153-63.
- Wang, H., Traub, L. M., Weixel, K. M., Hawryluk, M. J., Shah, N., Edinger, R. S., Perry, C. J., Kester, L., Butterworth, M. B., Peters, K. W. et al.** (2006b). Clathrin-mediated endocytosis of the epithelial sodium channel. Role of epsin. *J Biol Chem* **281**, 14129-35.
- Wang, J., Barbry, P., Maiyar, A. C., Rozansky, D. J., Bhargava, A., Leong, M., Firestone, G. L. and Pearce, D.** (2001). SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**, F303-13.
- Wang, Z., Frederick, J. and Garabedian, M. J.** (2002). Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem* **277**, 26573-80.
- Webster, J. C., Huber, R. M., Hanson, R. L., Collier, P. M., Haws, T. F., Mills, J. K., Burn, T. C. and Allegretto, E. A.** (2002). Dexamethasone and tumor necrosis factor-alpha act

together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types. *Endocrinology* **143**, 3866-74.

Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K. R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P. et al. (2004). NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* **53**, 1658-64.

Wikström, A. C. (2003). Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. *J Endocrinol* **178**, 331-7.

Wisdom, R. and Lee, W. (1991). The protein-coding region of c-myc mRNA contains a sequence that specifies rapid mRNA turnover and induction by protein synthesis inhibitors. *Genes Dev* **5**, 232-43.

Wong, M., Ziring, D., Korin, Y., Desai, S., Kim, S., Lin, J., Gjertson, D., Braun, J., Reed, E. and Singh, R. R. (2008). TNFalpha blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin Immunol* **126**, 121-36.

Wu, L. and Belasco, J. G. (2008). Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **29**, 1-7.

Xavier, R. J. and Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**, 427-34.

Xu, B. E., Stippec, S., Chu, P. Y., Lazrak, A., Li, X. J., Lee, B. H., English, J. M., Ortega, B., Huang, C. L. and Cobb, M. H. (2005). WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10315-20.

Yang, L. M., Rinke, R. and Korbmacher, C. (2006). Stimulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by cAMP involves putative ERK phosphorylation sites in the C termini of the channel's beta- and gamma-subunit. *J Biol Chem* **281**, 9859-68.

Young, J. A., Cook, D. I., Lingard, J. M., Van Lennep, E. W. and Wegman, E. (1996). Funktion des Magen-Darm-Trakts. In *Lehrbuch der Physiologie*, R. Klinke und S. Silbernagel, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 2. Auflage, Kapitel 16

Yudt, M. R. and Cidlowski, J. A. (2002). The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* **16**, 1719-26.

Yun, C. C., Chen, Y. and Lang, F. (2002). Glucocorticoid activation of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 3 revisited. The roles of SGK1 and NHERF2. *J Biol Chem* **277**, 7676-83.

Zeissig, S., Bergann, T., Fromm, A., Bojarski, C., Heller, F., Guenther, U., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2008). Altered ENaC expression leads to impaired sodium absorption in the noninflamed intestine in Crohn's disease. *Gastroenterology* **134**, 1436-47.

Zeissig, S., Bojarski, C., Bürgel, N., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2004). Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut* **53**, 1295-302.

Zeissig, S., Fromm, A., Mankertz, J., Weiske, J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2007). Butyrate induces intestinal sodium absorption via Sp3-mediated transcriptional up-regulation of epithelial sodium channels. *Gastroenterology* **132**, 236-48.

Zeissig, S., Fromm, A., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2006). Restoration of ENaC expression by glucocorticoid receptor transfection in human HT-29/B6 colon cells. *Biochem Biophys Res Commun* **344**, 1065-70.

Zhang, W., Xia, X., Reisenauer, M. R., Rieg, T., Lang, F., Kuhl, D., Vallon, V. and Kone, B. C. (2007). Aldosterone-induced Sgk1 relieves Dot1a-Af9-mediated transcriptional repression of epithelial Na⁺ channel alpha. *J Clin Invest* **117**, 773-83.

Zhang, Z., Jones, S., Hagood, J. S., Fuentes, N. L. and Fuller, G. M. (1997). STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem* **272**, 30607-10.

Zhou, J. and Cidlowski, J. A. (2005). The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* **70**, 407-17.

8 ABKÜRZUNGEN

ACE	<i>Angiotensin-converting Enzyme</i>
ADH	Antidiuretisches Hormon
AF	<i>Activating function</i>
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic Acid
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinase</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CMV	Cytomegalie-Virus
C-Terminus	Carboxyterminus
CU	Colitis Ulcerosa
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DBD	DNA-bindende Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ENaC	Epithelialer Natrium-Kanal
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Glucocorticoid
GILZ	<i>Glucocorticoid-induced Leucin Zipper</i>
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	<i>Glucocorticoid Response Element</i>
HRE	<i>Hormone Response Element</i>

Hsp	<i>Heat Shock Protein</i>
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
I _{sc}	Kurzschlussstrom
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
LBD	Liganden-bindende Domäne
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MAPKAPK	<i>MAPK-activated Protein Kinase</i>
MC	Morbus Crohn
MC	Mineralocorticoid
MMTV	Maus-Mammatumovirus
MR	Mineralocorticoidrezeptor
MW	Mittelwert
Nedd4-2	<i>Neural Precursor Cell-expressed, Developmentally Downregulated Gene 4</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>
NHE3	<i>Na⁺/H⁺-Exchanger 3</i>
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	<i>3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PHA-I	Pseudohypoaldosteronismus Typ I
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
R ^t	transepithelialer Widerstand
SCNN1	<i>Sodium Channel Non-neuronal 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Mittlerer Standardfehler (<i>Standard error of the mean</i>)
SGK-1	<i>Serum- and Glucocorticoid-induced Kinase-1</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TRE	<i>Tet-responsive element</i>

Alle hier nicht aufgeführten Einheiten sind SI-Einheiten. Aminosäuren wurden mit dem Dreibuchstabencode abgekürzt.

Publikationen

Originalarbeiten:

- Bergann T, Plöger S, Fromm A, Zeissig S, Borden SA, Fromm M, Schulzke JD. (2009). A colonic mineralocorticoid receptor cell model expressing epithelial Na⁺ channels. **Biochem Biophys Res Commun** 382: 280-285.
- Bergann T, Zeissig S, Fromm A, Richter JF, Fromm M, Schulzke JD. (2009). Glucocorticoids and tumor necrosis factor- α synergize to induce absorption by the epithelial sodium channel in the colon. **Gastroenterology** 136: 933-942.
- Zeissig S, Bergann T, Fromm A, Bojarski C, Heller F, Günther U, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. (2008). Altered ENaC expression leads to impaired sodium absorption in the noninflamed intestine in Crohn's disease. **Gastroenterology** 134: 1436-1447.
- Textoris-Taube K, Henklein P, Pollmann S, Bergann T, Weisshoff H, Seifert U, Drung I, Mügge C, Sijts A, Kloetzel PM, Kuckelkorn U. (2007). The N-terminal flanking region of the TRP2₃₆₀₋₃₆₈ melanoma antigen determines proteasome activator PA28 requirement for epitope liberation. **J Biol Chem** 282: 12749-12754.

Tagungsbeiträge:

Vorträge:

- 21th Meeting European Intestinal Transport Group (EITG), Oberwiesenthal, 3. - 6. März 2007.
Bergann T, Fromm A, Zeissig S, Schön S, Mankertz J, Fromm M, Schulzke JD. Interaction of dexamethasone and TNF- α in the regulation of ENaC-mediated sodium transport.
Abstract erschienen in: Journal of Physiology and Biochemistry 2007; 63: 19.
Vortrag
- 61. Jahrestagung der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten), Hannover, 13. - 16. Sept. 2006.

Bergann T, Fromm A, Zeissig S, Schön S, Mankertz J, Fromm M, Schulzke JD. Interaktion der Stimulation des elektrogenen Natrium-Transports durch TNF- α und Dexamethason.

Vortrag

Posterpräsentationen:

- 63. Jahrestagung der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten), Berlin, 1. - 4. Okt. 2008.

Bergann T, Zeissig S, Fromm A, Richter JF, Fromm M, Schulzke JD. Einfluss von TNF- α auf die Dexamethason-vermittelte Induktion des epithelialen Natrium-Kanals (ENaC).

Z. Gastroenterol. 46:988.

Poster

- 6th International Symposium on „Aldosterone and ENaC: from gene to disease“, Zermatt, Schweiz, 3. - 7. Okt. 2007.

Bergann T, Zeissig S, Fromm A, Richter JF, Fromm M, Schulzke JD. Interaction of dexamethasone and TNF- α in the regulation of ENaC-mediated sodium transport.

Poster

Teilnahme:

- International Conference on „Molecular Structure and Function of the Tight Junction“, Berlin, 25. - 27. April 2008

Lebenslauf

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke** (Medizinische Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, Charité Campus Benjamin Franklin), der mir die Möglichkeit gab, in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit über ein sehr interessantes Thema anzufertigen.

Bei Herrn **Prof. Dr. Rupert Mutzel** (Institut für Biologie, Freie Universität Berlin) möchte ich mich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit an der Freien Universität Berlin bedanken.

Herrn **Prof. Dr. Michael Fromm** (Institut für Klinische Physiologie) danke ich für seine engagierte Unterstützung und für das Korrekturlesen der Veröffentlichungen und dieser Arbeit.

Mein großer Dank gebührt **Anja Fromm** für ihre zahlreichen Ideen und die unermüdliche Unterstützung bei dieser Arbeit. Ich danke **Dr. Sebastian Zeissig** für die produktive Zusammenarbeit im Labor und bei gemeinsamen Veröffentlichungen.

Dr. Steffen Borden und **Tim Ziera** danke ich für die freundliche Kooperation mit der Bayer Schering Pharma AG, Berlin.

Ganz herzlich danke ich **Claudia May, Irene Meier, Svenja Plöger, Martin Voss, Nina Hering, Susanne Milatz** und **Dr. Roland Bucker** und für die gemeinsame Zeit im Labor, das Arbeiten mit ihnen hat mir viel Spaß gemacht. **Nina Hering** danke ich außerdem für die sehr angenehme Nachbarschaft. **Dr. Roland Bucker** danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiter möchte ich **Dr. Jan Richter** für die konstruktiven Diskussionen und das Anfeuern in der Endphase danken. **PD Dr. Dorothee Günzel** danke ich herzlich für die Durchsicht dieser Arbeit. Bei Herrn **Ing. grad. Detlef Sorgenfrei** möchte ich mich ganz besonders für die häufige Rettung bei technischen Problemen bedanken und bei **Susanna Schön** für ihre tatkräftige experimentelle Unterstützung.

Den Tight Junctions-Mitgliedern **Susanne Krug, Dr. Christian Bojarski** und **PD Dr. Salah Amasheh** danke ich für die gute Zusammenarbeit und für das gemeinsame Musizieren.

Allen weiteren Mitgliedern des Instituts für Klinische Physiologie und der Med. Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie danke ich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein tiefer Dank gilt meinen **Eltern**, die mich unterstützten und auf die ich mich immer verlassen kann. Außerdem danke ich meiner **Schwester** und meinen **Freunden** für die schönen Zeiten. Ich danke ihnen allen auch für das aufwändige Korrekturlesen des Manuskripts.